Parijs 1981.

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

pour obtenir le Titre de :

DOCTEUR 3e CYCLE

Specialité : Biophysique

par

Mlle Katalin TÓTH

Sujet de la thèse : Etudes des bactériophages T7, MS-2 ET ΦX-174 par dichroïsme circulaire et l'absorption UV. Mise en évidence de l'effet des très petites doses de rayonnement ultraviolet sur le bactériophage T7 "in vivo".

Soutenue le 23 février 1981 devant la commission composée de :

M. M. DUQUESNE	Président
M. M. BALKANSKI	Examinateur
M. C. HELENE	"
M. J. BOLARD	"
Mme H. ASLANIAN	"

T H E S E présentée

pour l'obtention

du

DIPLOME de DOCTEUR de 3è CYCLE

à

L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

- Paris 6 -

Specialité : Biophysique

par

Mlle Katalin TÓTH

Sujet de la thèse : Etudes des bactériophages T7, MS-2 ET ΦX-174 par dichroisme circulaire et l'absorption UV. Mise en évidence de l'effet des très petites doses de rayonnement ultraviolet sur le bactériophage T7 "in vivo".

Soutenue le 23 Février 1981 devant la commission composée de :

M. M. DUQUESNE	Président
M. M. BALKANSKI	Examinateur
M. C. HELENE	"
M. J. BOLARD	"
Mme D. ASLANIAN	"

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au cours du stage effectué dans le laboratoire de Physique des Solides-Spectroscopie des Solides, associé au C.N.R.S., Université Pierre et Marie CURIE.

J'exprime ma respectueuse gratitude à Monsieur le Professeur M. BALKANSKI, qui m'a accueilli dans son laboratoire et assurait constamment les conditions nécessaires à un travail fructueux.

J'exprime toute ma reconnaissance à Madame D. ASLANIAN qui m'a proposé le sujet de cette thèse. Sa bienveillance et amitié à mon égard depuis mon arrivée en France, ses encouragements et ses aides précieuses ont été indispensables pour réaliser ce travail, depuis les recherches expérimentales jusqu'à la présente rédaction.

J'ai bénéficié de la collaboration de Monsieur J. BOLARD, d'une part par la possibilité qu'il m'a donnée d'effectuer le travail expérimental dans son laboratoire, et, d'autre part, par l' aide notable qu'il m'a apporté grâce à sa grande connaissance du dichroïsme circulaire. Qu'il soit donc assuré de ma gratitude.

Monsieur le Professeur M. DUQUESNE m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de thèse je lui en suis reconnaissante.

Je remercie également Monsieur le Professeur C. HELENE pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et pour avoir bien voulu participer au jury.

A Madame E. MOUSTACCHI, je suis reconnaissante pour ces remarques précieuses sur le manuscrit.

L'aide technique de Monsieur GUESDON m'a beaucoup facilité le travail, qu'il soit remercié ici.

Mes remerciements vont aussi à Madame J. NGUYEN qui s'est chargée de la frappe soignée de ce travail, Madame PLANCKE pour son aide gentille, ainsi qu'à Mesdames CREPIN et BOUDON qui se sont occupées du tirage avec beaucoup de soin.

A Monsieur J. TARJÁN et Madame Gy. RONTÓ, professeurs de l'Institut de Biophysique de l'Université de Médecine à Budapest, j'exprime toute ma gratitude pour m'avoir accordé leur confiance et le soutien nécessaire pour préparer et effectuer ce stage au laboratoire de Physique des Solides. Je voudrais également remercier les membres du laboratoire de phage du même institut pour les préparations des échantillons.

Köszönöm.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547321_0015

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I. NOTION DES BACTRIOPHAGES 3
1.1. STRUCTURE 3
1.2. MECANISME DE L'INFECTION DES BACTERIES ET MULTIPLICATION DES PHAGES 6
1.3. CARACTERISATION DES PHAGES ETUDIES 7
1.3.1. Le bactériophage T7 7
1.3.2. Le bactériophage MS-2 11
1.3.3. Le bactériophage ΦX-174 11
1.3.4. Paramètres caractéristiques 12

CHAPITRE II. EFFET BIOLOGIQUE DU RAYONNEMENT ULTRAVIOLET . 13
2.1. PHOTOREACTIONS ET PHOTOPRODUITS 13
2.2. ETUDES LES PLUS IMPORTANTES LIEES AU BACTERIOPHAGE T7..... 16

CHAPITRE III. ACTIVITE OPTIQUE DES ACIDES NUCLEIQUES 19
3.1. GENERALITES 19
3.2. ACIDES NUCLEIQUES 22

CHAPITRE IV. MATERIEL ET METHODES 29
4.1. PREPARATION DES ECHANTILLONS 29
4.2. ABSORPTION UV..... 30
4.3. DICHROISME CIRCULAIRE 32
4.4. LA DENATURATION THERMIQUE DU PHAGE T7 33
4.4.1. Absorption UV 33
4.4.2. Dichroisme circulaire (D.C.) 34

CHAPITRE V. RESULTATS ET DISCUSSIONS 35
5.1. ETUDE DES BACTERIOPHAGES T7, ΦX-174 et MS-2 PAR ABSORPTION U.V. ET D.C. 35
5.1.1. Spectres d'absorption UV 35
5.1.2. Spectres de D.C. 37
5.1.2.1. Spectres de D.C. des phages à ADN T7 et ΦX-174 37

5.2. CONFORMATION ET CHANGEMENTS CONFORMATIONNELS DE L'ADN BICATENAIRE "in situ"..... 40

5.2.1. Conformation de l'ADN bicaténaire du phage T7..... 40

5.2.2. Changements conformationnels de l'ADN "in situ" étudiés par dénaturation thermique du bactériophage T7..... 41

5.2.3. Effet d'une petite dose d'irradiation UV sur le processus de fusion de l'ADN "in situ" 49

CONCLUSION 51

BIBLIOGRAPHIE 53

INTRODUCTION

Les bactériophages sont parmi les entités biologiques les plus simples, qui se multiplient au sein des bactéries avec une rapidité remarquable. Dotés de molécules d'acides nucléiques beaucoup plus petites que celles des organismes complexes, ils sont devenus un outil inestimable pour étudier certains processus biologiques fondamentaux, ainsi que l'effet des rayonnements ultraviolets sur la matière vivante. Leur simplicité facilite aussi les manipulations au cours des expériences biophysiques.

L'effet biologique du rayonnement ultraviolet sur les bactériophages se manifeste déjà à de très petites doses. Mais les changements conformationnels étant très fins, ils ne sont détectables que par des méthodes extrèmement sensibles aux variations structurales. Une telle méthode est la spectrométrie du dichroisme circulaire que nous avons appliqué d'abord à l'étude de la structure des acides nucléiques des bactériophages T7, MS-2 et ΦX-174. Ensuite, nous l'avons utilisé pour étudier l'effet du rayonnement ultraviolet sur le bactériophage T7 "in vivo", avec une dose de 3×10^{16} photons/cm^2 qui est très proche de la dose biologique minimale (10^{15} photons/cm^2) à laquelle se manifestent les premières mutations. Les résultats obtenus permettent de démontrer que dans le phage T7 irradié avec de petites doses d'UV apparaissent des photoproduits qui favorisent la diminution coopérative de la chiralité de l'ADN au cours de la thermodénaturation.

Le chapitre I présente tout d'abord la structure générale des bactériophages et leur fonctïonnement biologique : l'infection des bactéries et la multiplication des phages. Ensuite, une description plus détaillée concerne la caractérisation des bactériophages étudiés (T7, MS-2, ΦX-174)en soulignant les différences entre la structure de leurs molécules d'acides nucléiques.

Dans le chapitre II nous rappelons l'effet biologique du rayonnement ultraviolet, les photoréactions et les photoproduits prédominants. Les études biophysiques et biologiques les plus importantes, concernant les photoréactions du bactériophage T7 y sont résumées.

L'introduction dans la théorie de l'activité optique des acides nucléiques fait l'objet du chapitre III.

Les méthodes de préparation des échantillons et les dispositifs expérimentaux en absorption UV et D.C. sont présentés dans le chapitre IV.

Le chapitre V est consacré aux résultats et aux discussions. Les spectres de DC des bactériophages T7, MS-2 et ΦX-174 sont comparés aux spectres d'absorption UV. Nous discutons la relation entre les spectres de DC et la conformation des acides nucléiques "in situ" dans les phages. Ensuite les spectres de DC du bactériophage T7 et de son ADN isolé sont comparés par rapport à leur conformation. La thermodénaturation du phage T7 est étudiée sur les spectres de DC en fonction de la température. La courbe de fusion enregistrée par DC est comparée à celle déterminée par l'absorption UV. Les transitions de phase sont discutées. L'effet de très petites doses du rayonnement UV sur le bactériophage T7 est démontré par la comparaison entre les courbes de fusion en DC des phages irradiés et non irradiés, obtenues par DC.

CHAPITRE I

NOTION DES BACTERIOPHAGES

1.1. STRUCTURE

Les bactériophages ou les phages sont des virus qui s'attaquent aux bactéries. Leur découverte vers le début de ce siècle a suscité un très gros intérêt, car à l'époque, on espérait qu'ils pourraient constituer un moyen simple et efficace de lutter contre les maladies bactériennes. Mais les phages n'ont pas pu être utilisés à cette fin puisque les bactéries mutent rapidement vers des formes qui deviennent résistantes aux phages. Une perte générale d'interêt sur les phages a suivi cette déception. Dans les années 1930 un groupe de chercheurs s'aperçu que les phages, faisant partie de l'univers biologique, obéissent aux même règles génétiques que les autres organismes vivants. La découverte de la recombinaison génétique des phages (Delbruck et Bailey 1946) a stimulé de nombreuses études visant à comprendre les lois génétiques en général.

Il y a de différents types de bactériophages capables d'infecter spécifiquement presque toutes les bactéries connues. Mais en 1944 plusieurs chercheurs se mettent d'accord pour étudier une seule bactérie, Escherichia Coli, et une seule catégorie de phage, la série T. Cette série contient sept phages, de T1 à T7. Au début les objets favoris d'études ont été les phages T2, T4 et T6 qui sont très voisins. Les détails qu'on connait aujourd'hui sur la structure et la fonction des phages proviennent surtout d'études de ces phages T-pairs. Plus tard il devint évident que ces phages n'étaient pas aussi simples qu'on l'espérait. Vers les années 1960, les phages impairs ainsi que d'autres types de phages plus simples commencèrent à attirer l'attention des chercheurs. L'avantage principal du phage T7, par exemple, réside dans le fait qu'il porte seulement 1/4 de l'information génétique de phage T-pairs (Studier 1965).

Depuis longtemps on sait que les phages sont beaucoup plus petits que les bactétries, puisqu'ils passent à travers des filtres qui arrêtent les bactéries (Elford et Andrewes 1932).

Leurs dimensions ont été estimées entre 21 et 90nm, en accord raisonnable avec les valeurs trouvées plus tard par microscopie électronique. Le développement des méthodes et appareils modernes tels que l'ultracentrifugeuse analytique, ont permis d'obtenir des valeurs plus exactes sur la constante de sédimentation et le coefficient de diffusion des phages (Cummings et Kozloff 1960). A partir de ces deux paramètres on a calculé que le poids d'un phage T2 est d'environ 215 millions daltons ou $3,3 \times 10^{-16}$ grammes.

Lorsque l'isolement et la purification des phages ont été réalisées, la microscopie électronique et les méthodes biochimiques ont permis d'étudier la structure de phage purifié et la conformation de ses molécules constitutives. Ainsi on a pu étudier l'architecture des composants du phage isolé au niveau anatomique et au niveau chimique.

L'anatomie microscopique distingue une tête et une queue dans la structure des phages T. (Fig. 1). La tête peut être décrite comme un dérivé de l'icosaèdre. Elle comporte une capside extérieure qui enferme la molécule d'acide nucléique et des protéines internes, associées dans une structure très ordonnée. La capside est constituée par des unités protéiques externes assemblées en capsomère. Il faut mentionner que la taille moyenne de la capside est généralement beaucoup plus petite que la longueur de la molécule d'acide nucléique. La queue se présente comme une gaine hélicoidale formée d'unités protéiques identiques, groupées en anneaux superposés qui enferment un axe tubulaire. Elle se termine par une plaque qui porte des épines et des fibres caudales. La taille des différentes parties et le nombre des fibres caudales varient avec le genre de phage.

Les analyses chimiques ont confirmé aussi que chaque phage est constitué d'une molécule d'acide nucléique et de protéines. A l'opposé des cellules des organismes plus complexes, les phages ne contiennent qu'un seul type d'acide nucléique porteur d'informations génétiques. Cet acide nucléique peut être soit l'ADN, soit l'ARN. Il existe des phages à ADN bicaténaire et à ARN monocaténaire, les formes habituelles des acides nucléiques. Mais on trouve également des familles de phages à ADN monocaténaire. Dans les phages, l'acide nucléique peut avoir la forme circulaire ou linéaire. La longueur des molécules d'ADN ou d'ARN dépend du

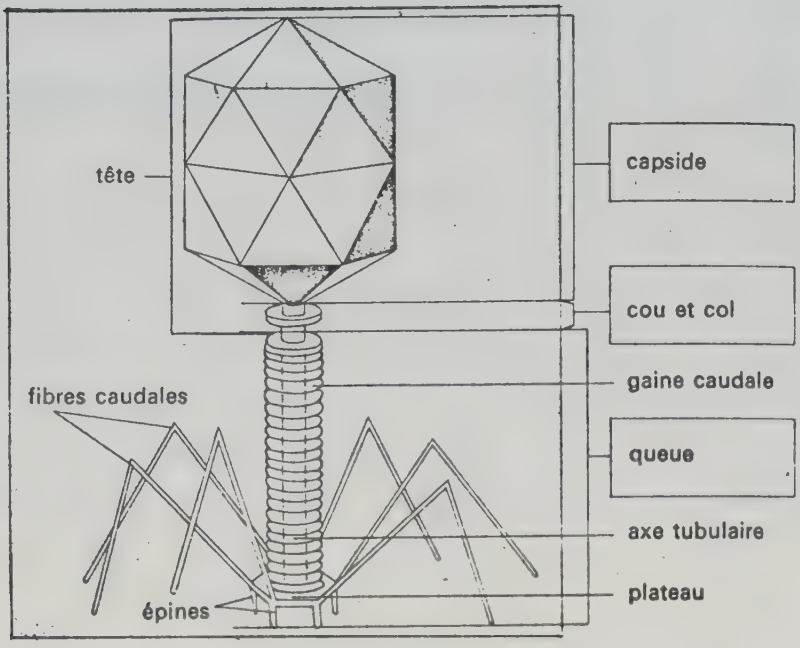


Fig. 1 : Anatomie microscopique du bactériophage T2
(d'après Berkaloff et al, 1977)

type de phage. Le nombre de bases constitutives varie entre un millier et plusieurs centaines de milliers. Ceci représente un nombre de gènes variant de 3 à 300. En ce qui concerne les protéines, dans des phages les plus simples, on n'en trouve qu'un seul type. Par contre, chez les plus grands, il en existe quelques dizaines de type. Le poids moléculaire et la séquence d'acides aminés des protéines isolées font objet de nombreuses études.

1.2. MECANISME DE L'INFECTION DES BACTERIES ET MULTIPLICATION DES PHAGES.

La fixation des phages sur la surface de la bactérie s'effectue par l'intermédiaire des fibres et du plateau situés à l'extrémité de la queue du phage (Fig.1) et à l'aide de sites spécifiques de la membrane bactérienne. Une perforation de la paroi bactérienne a lieu et par la contraction de la queue du phage son acide nucléique est injecté à l'intérieur de la bactérie. La capside protéique et la queue restent à l'extérieur et ne participent donc pas à la multiplication du phage au sein de la bactérie. Immédiatement après la pénétration dans la bactérie, l'acide nucléique (le génome) du phage entre en fonction : les processus synthétiques propres à la bactérie sont arretés et la synthèse des constituants phagiques commence. Avec une interruption artificielle de ce processus on peut observer que la synthèse des protéines et des copies de l'acide nucléique ont lieu simultanément (Serwer 1976). L'encapsidation de l'acide nucléique commence lorsque une quantité suffisante d'acide nucléique et de protéines est obtenue : les unités protéiques forment la capside en se rassemblant en structure régulière et l'acide nucléique prend une conformation compacte au milieu de la capside. Ensuite vient l'assemblage des têtes et des queues qui sont déjà formées. Ce dernier assemblage semble être un processus non enzymatique. Enfin par l'action d'enzymes spécifiques la rupture de la paroi bactérienne (la lyse) s'effectue et les phages mûrs sont libérés. Dans des conditions favorables, en une demi-heure environ, une centaine de phages identiques peuvent sortir d'une cellule bactérienne infectée par un seul phage. La réplication de l'acide nucléique, la recombinaison génétique,

la régulation de l'expression du gène sont étudiés sur des systèmes phage-bactérie.

1.3. CARACTERISATION DES PHAGES ETUDIES

Notre intérêt principal porte sur le phage T7, qui se range parmi les plus petits de la série T. Il nous a semblé intéressant de l'étudier avec deux autres petits phages qui s'attaquent eux-aussi à Escherichia coli car ces derniers possèdent des acides nucléiques différents de celui du phage T7.

1.3.1. Le Bactériophage T7

Il a été découvert en 1945 par Demerec et Fano. Sa ressemblance avec le phage T3 a été démontrée sérologiquement (Delbruck 1946). Dans les années qui ont suivi sa découverte, de nombreuses études ont été effectuées pour déterminer ses caractéristiques physiques (ex. Davison et Freifelder 1962, Freifelder 1970, Camerini-Otero et al, 1974 de Groot et al. 1977, Rontó 1979 et réf. inclues) Le poids moléculaire total du phage a été estimé à 55×10^6 daltons dont 50% pour l'acide nucléique. La précision de la détermination des dimensions du phage s'améliore de plus en plus. Les valeurs les plus précises ont été obtenues récemment par la diffusion des rayons X sous de petits angles ainsi que par la diffusion de neutrons ; dans les deux cas une méthode de contrastes a été appliquée (Agamalian et al. 1979, Fejgin et al. - communication privée). De plus, ces études ont été effectuées dans un milieu physiologique, donc les valeurs obtenues représentent les dimensions du phage "in vivo".

Le phage T7 possède une petite queue, longue de 17,5 nm qui est relativement simple et qui se termine par six fibres caudales (Fraser et Williams 1953). Sa tête a la forme d'un icosaèdre d'un diamètre de 60-68 nm. L'épaisseur de la coque protectrice protéique est 4 nm. La molécule d'ADN est enroulée à l'intérieur de la tête, autour d'une sphère protéique dont le diamètre est de l'ordre de 28 nm. En utilisant ces données, Fejgin (1980 - communication privée) a proposé le modèle du phage T7 que nous présentons sur la Fig.2.

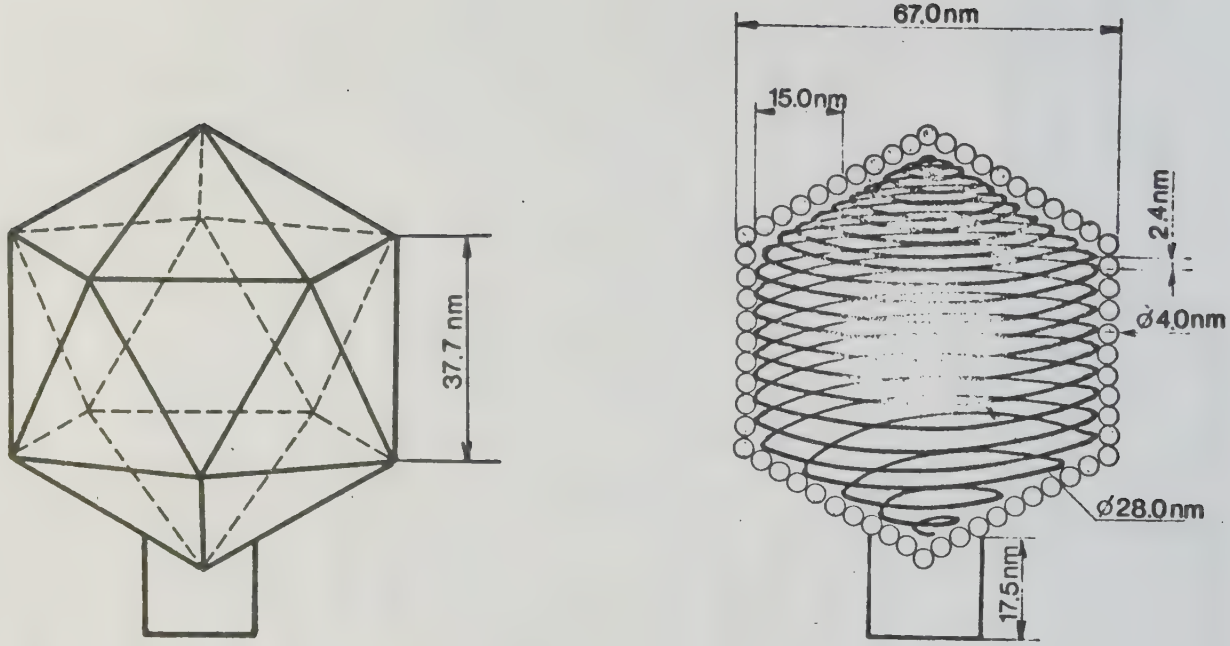


Fig. 2 : Modèle de la structure du bactériophage T7
(d'après Fejgin et al, 1980)

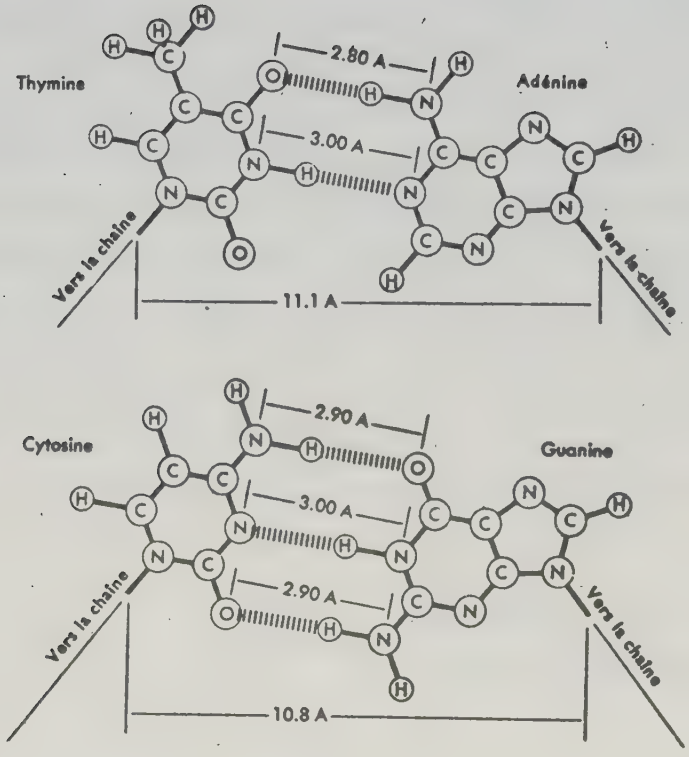


Fig. 3 : Appariement des bases dans 1'ADN.
(d'après Watson 1968)

Acides nucléiques . Le bactériophage T7 possède une molécule d'ADN bicaténaire d'un poids moléculaire de 26 x 10^6 daltons (Studier 1965). Elle contient les quatre bases habituelles : Thymine (T), adenine (A), guanine (G) et cytosine (C), appariées (Fig.3). Les paires C-G représentent 50% du total (Lunan et Sinsheimer 1956). La séquence complète de ces bases n'est pas encore connue. Néanmoins on a pu reconnaitre les régions riches en A-T et G-C (Pavlov et al 1977) et obtenir des séquences partielles de certaines régions (Grachev et al. 1979, Oakley, Coleman 1977, Rosenberg, Kramer 1977).

La molécule d'ADN du phage T7 se présente généralement avec une configuration en double hélice régulière. Il n'existe pas de données précises sur ses interactions avec les molécules protéiques internes et externes. On a comparé uniquement la thermostabilité d'ADN isolé et "In situ" par spectrométrie d'absorption UV et microcalorimétrie. Une température spécifique caractérise la dénaturation de l'ADN isolé. Par contre l'ADN "in situ" est caractérisé par deux températures spécifiques (Fig.4). Ce phénomène a été interprété comme dû à la présence de deux parties d'ADN, stabilisé et destabilisés, résultant de l'interaction de l'ADN avec les protéines internes du phage (Monaseldze et al. 1978).

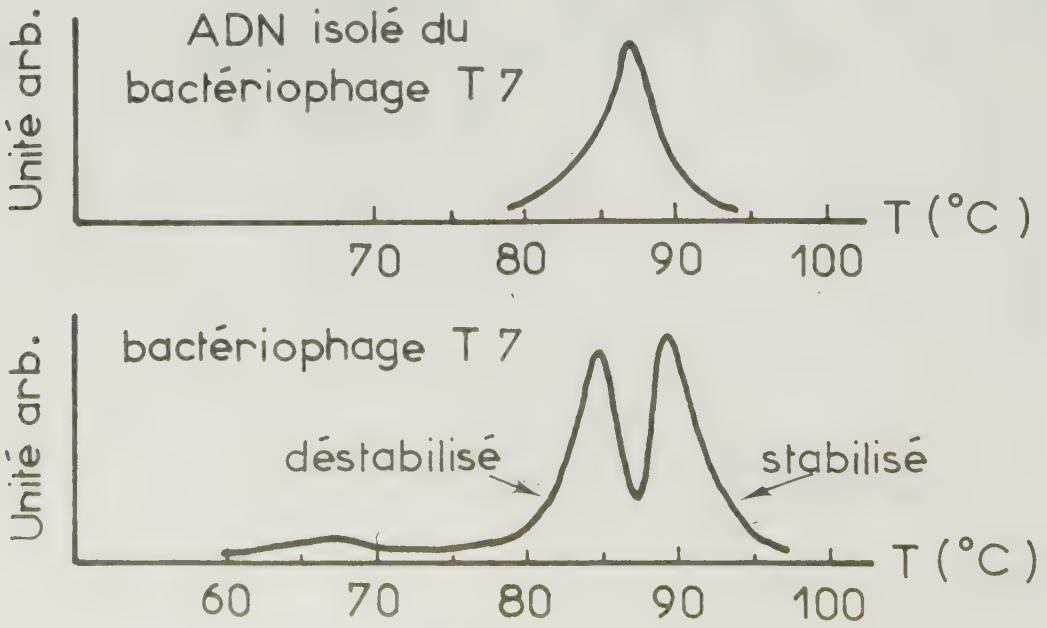


Fig. 4 : Dénaturation thermique de l'ADN du bactériophage T7 : isolé et "in situ" (d'après Monaselidze et al 1978).

Il n'y a pas encore de connaissances suffisantes sur la conformation d'ADN du phage "in situ", indispensables pour donner des interprétations plus complètes, par exemple sur l'effet des agents nuisibles tels que les produits chimiques ou le rayonnement ultraviolet.

Les protéines. Le phage mûr possède neuf types de protéines dont les poids moléculaires de 7000 à 15000 ont été déterminés par électrophorèse sur gel (Server 1976, 1978). Trois de ces protéines appartiennent à la queue et six se trouvent dans la tête du phage. Une parmi ces dernières prédomine par sa quantité : elle représente 60% des protéines de la tête. Son poids moléculaire est de 38000 et ses dimensions correspondent à l'épaisseur de la coque protectrice (Agamalian et al. 1979).

1.3.2. Le bactériophage MS-2

C'est un petit phage sphérique qui contient une molécule d'ARN monocaténaire (Knight 1974 et réf. inclues). Il a été parmi les premiers phages dont on a découvert la séquence totale des bases de l'acide nucléique (Min Jou et al. 1972, Fiers et al. 1975, 1976). Elle comporte les bases habituelles de l'ARN : A,G,C, U (uracile). On observe de nombreux appariements des bases de la même chaine qui entrainent la conformation en "épingle à cheveux" (Min Jou et al. 1972). Cela a été confirmé par des études en spectrométrie Raman (Thomas et al. 1976). La capside du phage MS-2 est composé de deux types de protéines : l'un comporte une unique molécule de protéine de poids moléculaire 38000 tandis que l'autre "coat protéin" possède 180 molécules identiques dont le poids moléculaire est 14000. La structure secondaire de la "coat protéin" a été étudiée par spectrométrie Raman (Thomas et al. 1976) : environ 60% de cette protéine possède une conformation β tandis que le reste est en conformation α ou désordonnée.

1.3.3. Le bactériophage Φ x-174.

Il est le plus petit phage icosaèdrique (diamètre $\sim$ 25 nm) à ADN qui infecte Escherichia Coli (Sinsheimer 1959). Son ADN est monocaténaire et circulaire. Il contient 5400 bases dont la séquence a été découverte récemment (Sanger et al. 1977, Brown et Smith 1977, Ravateli et al. 1977). Dans le phage mûr on trouve 4 types de protéines de poids moléculaire 4000 à 48000 (Sanger et al. 1977).

1.3.4. Paramètres caractéristiques.

Certains paramètres caractéristiques connus des trois phages sont rassemblés dans le tableau I.

TABLEAU I

	T7	MS-2	ϕx-174
Poids moléculaire (daltons)	55×10^6 (1-4)	$3{,}6 \times 10^6$ (17)	$6{,}2 \times 10^6$ (23)
volume (nm^3)	$1{,}2 \times 10^5$ (4)		
forme de la tête	icosaèdre (2-4)	sphérique (18)	icosaèdre (24)
diamètre de la tête (nm)	60 - 68 (2,5,6)	26 (18)	24-30(23,24)
longueur de la queue (nm)	17,5		
constante de diffusion translationnelle (cm^2/mg)	1×10^{-7} (8)		
const. de diffusion rotationnelle (s^{-1})	5356 (7,9)		
moment dipolaire (Debye)	5600 (7,9)		
taux de l'acide nucléique (%)	∿50 (1,2)	∿31,5 (17)	∿25,5 (23)
	ACIDES NUCLEIQUES		
types	ADN (1) bicaténaire linéaire	ARN (17) monocaténaire linéaire	ADN (23,25) monocaténaire circulaire
nombre de bases (paires)	40000 (10) (paires)	3560 (19,21)	5375 (25,26)
taux de G-C	50%		
séquence de bases	connue (12-14) partiellement	connue (19-21) entièrement	(connue (25,26) entièrement
nombre de gènes	30 (1,11)	3 (19-21)	9 (25)
longueur de la molécule (nm)	$12\text{-}15 \times 10^3$ (15)		
	PROTEINES		
nombre de types	9 (16)	2 (22)	4 (27)
poids moléculaire (daltons)	$7\text{-}150 \times 10^3$ (16)	38×10^3 14×10^3(22)	$4\text{-}48 \times 10^3$ (27)

Réf : (1) Studier 1969 ; (2) Freifelder 1970 ; (3) Bahr et al. 1976 ; (4) Fejgin et al. -Commun. privée 1980 ; (5) Camerini-Otero et al. 1974 (6) Fejgin,-commun.privé 1980 ; (7) DeGroot at al. 1977 ; (8) Tamás et al. 1966 ; (9) Kosturko et al. 1979 ; (10) McDonell et al. 1977 ; (11) Studier 1972 ; (12) Oakley et Coleman 1977 ; (13) Rosenberg et Kramer 1977 ; (14) Grachev et al. 1979 ; (15) Misra et al. 1969 ; (16) Server 1978 ; (17) Strauss et Sinsheimer 1963 ; (18) Weissman 1959 ; (24) Hall et al. 1959 ; (25) Sanger et al. 1977 ; (26) Smith et al 1977 ; (27) Denhardt.D.T. 1975.

CHAPITRE II

EFFET BIOLOGIQUE DU RAYONNEMENT ULTRAVIOLET

L'action du rayonnement ultraviolet (UV) sur la matière vivante a été demontrée sur un éventail très large d'échantillons du virus jusqu'aux mammifères.

Le rayonnement UV qui fait partie de la radiation solaire arrivant sur la terre, a été divisé en deux zones : l'une appelée l'UV-proche, située entre 380-300 nm et l'autre, l'UV-lointain au dessous de 300 nm. Cette division, assez arbitraire, se justifie par les réactions des êtres vivants.

Les systèmes biologiques supportent bien le rayonnement UV-proche qui arrive en grande quantité dans la biosphère. C'est l'UV-lointain qui possède un effet destructif. La majeure partie de ce dernier est absorbée dans la couche protectrice d'ozone de l'atmosphère. Récemment on a signalé la diminution de cette couche protectrice provoquée par la pollution de l'atmosphère conduisant à l'augmentation de la quantité de l'UV-lointain dans la biosphère. Ce danger a stimulé les recherches photobiologiques.

2.1. PHOTOREACTIONS ET PHOTOPRODUITS.

Les valeurs de l'énergie du rayonnement UV se situent entre 3,31 et 12,4 eV. Par conséquent, elles dépassent les énergies des liaisons chimiques des molécules, à l'exception des plus fortes liaisons doubles et triples (Pauling 1960). Ainsi lorsque la matière vivante est soumise à l'action du rayonnement UV un nombre important des molécules constitutives peut être affecté et donner lieu à des réactions photochimiques, soit par absorption directe, soit par photosensibilisation. Ce dernier processus peut conduire à la modification chimique d'un constituant qui n'aurait pas absorbé directement le rayonnement incident.

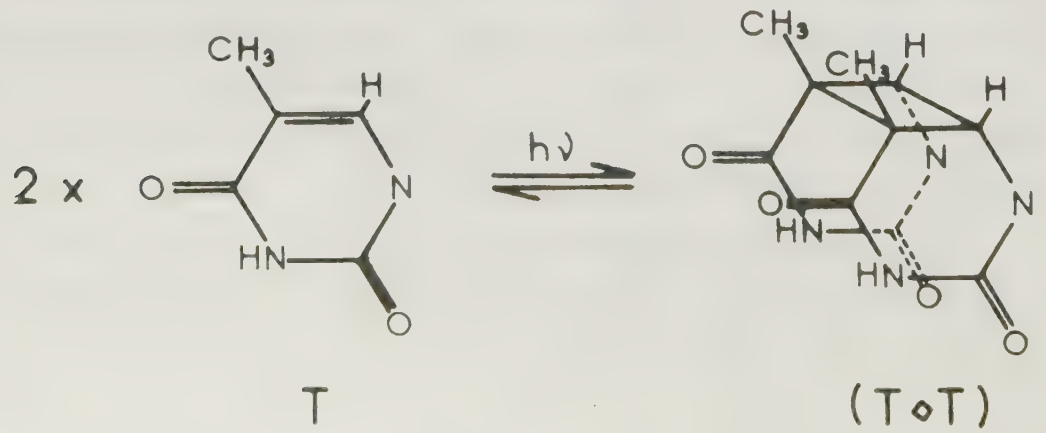
Les méthodes biochimiques, physico-chimiques et biophysiques ont été appliquées pour étudier les produits des photoréactions "in vivo" et "in vitro".

Parmi les biomolécules importantes les acides nucléiques et les protéines occupent une place privilégiée par rapport au rayonnement UV puisqu'elles l'absorbent directement. Déjà en 1930, Gates a reconnu le rôle -clé des acides nucléiques lié à l'effet **léthal** du rayonnement UV. Plus tard Kaplan (1952) confirme l'importance de l'ADN dans les mutations des bactéries provoquées par le rayonnement UV, en comparant les spectres d'action et d'absorption.

L'identification des photoproduits a imposé d'abord l'isolement de ces produits et leur analyse par des méthodes physiques : spectrométrie d'absorption, de fluorescence, IR, RMN, diffraction des rayons X. Ensuite, différentes méthodes biochimiques ont été appliquées pour leurs identification, comme le marquage radioactif d'ADN et son hydrolyse non enzymatique et enzymatique (Wang 1976).

Les principaux photoproduits identifiés concernent essentiellement les bases pyrimidiques des acides nucléiques en raison de leur activité photochimique beaucoup plus grande que celle de leurs bases puriques. En effet les bases subissent différentes altérations photochimiques, mais seulement trois types de réactions pyrimidiques sont habituellement significatives :

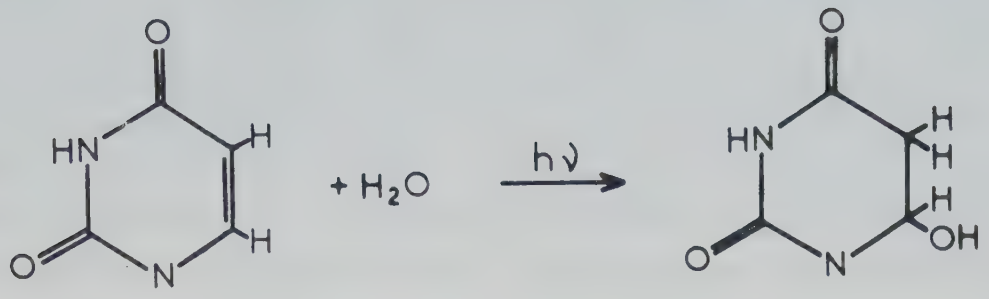
1. Le premier type de photoréactions, le plus important, est la dimérisation de deux bases pyrimidiques voisines dans une chaine. Le dimère, le produit de la réaction, contient deux liaisons formant un cycle cyclobutane. La dimérisation est photoréversible.



T (T◦T)

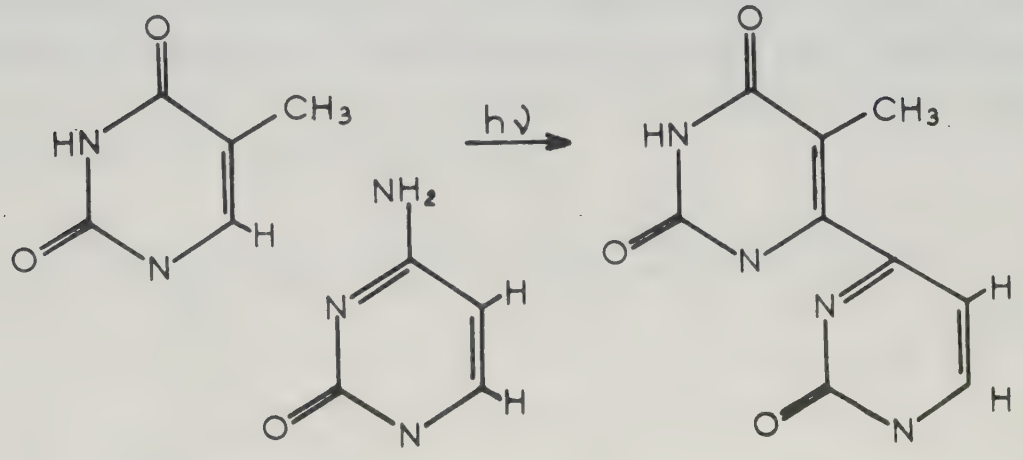
cis-syn
/isomère le plus fréquente dans l'ADN/

2. Le deuxième type de photoréactions est la photohydratation de la cytosine ou l'uracile.



U hU

3. Le troisième type de photoréactions est la formation des produits d'addition de deux bases pyrimidiques.



T + C T(6-4')Py

Ces produits d'addition qui ne contiennent qu'une liaison entre les deux bases constitutives sont moins stables que les dimères cyclobutile contenant deux liaisons.

En utilisant des doses UV élévées, on a pu détecter d'autres types de photoréactions comme la coupure d'une ou de deux chaines, les pontages entre les deux chaines ou entre l'acide nucléique et les protéines.

2.2. ETUDES LES PLUS IMPORTANTES LIEES AU BACTERIOPHAGE T7.

De nombreuses études ont été effectuées pour comprendre les photoréactions provoquées par le rayonnement ultraviolet dans le phage T7 total ainsi que dans l'ADN isolé.

Les résultats les plus significatifs sont les suivants :

1. Patrick (1977), Patrick et Gray (1976) en irradiant des phages et de l'ADN isolé avec des rayonnement UV de λ = 254 et 280 nm et une dose de 4kj/m^2, constatent que les produits prédominants des photoréactions sont les deux dimères suivants :

thymine - thymine (T<>T)cis-syn et

cytosine - thymine (C<>T).

On observe aussi un troisième produit qui est un produit d'addition :

cytosine - thymine (C-T).

Les quantités de ces produits (en %) ont été déterminées par séparation chromatographique, précédée par une hydrolyse en milieu acide. Les valeurs obtenues sont rassemblées dans le tableau II.

Tableau II

Dose kJ/m^2	λ nm	ADN irradié	T<>T/T^* %	C<>T/T^* %	T-C/T^* %	autres %
4	254	Dans le phage	5,1	1,3	0,63	<0,1
		isolé	6.0	2,0	0,82	<0,1
	280	Dans le phage	5,1	1,3	0,62	<0,1
		isolé	5,2	1,5	0,63	<0,1

T^* - thymine marquée

2. Sutherland et al. (1979) soumettent l'ADN isolé du phage T7 au rayonnement UV (λ=289nm) dont la dose varie entre 4,5 et 25 kJ/m^2. L'étude a été effectueé à l'aide de l'interaction spécifique d'une molécule (Netropsine) avec les paires intactes, de (A-T). Les changements de la structure bicatenaire d'ADN ont été expliqués par la rupture des liaisons H de paires (A-T) dûe à la formation des dimères de thymine.

3. Monaselidze et al. (1978) utilisent une dose de 0,1 kJ/m^2 et λ=254nm pour étudier l'ADN "in situ" par la microcalorimétrie différentielle. La température de transition des phases de la partie d'ADN destabilisé (Fig.4) diffère de 1,4°C par rapport à la température d'ADN non irradié. En même temps on observe un élargissement de 15% du profil de cette transition. Les variations ont été liées à la présence de photoproduits (environs 0,05% dimère/pyrimidine) qui renforce la destabilisation de l'ADN irradié "in situ".

4. L'inactivation des phages T7 en fonction des photons absorbés/cm^2 (Rontó et al.1967)avec des doses de rayonnement UV au-dessous de 0,1kJ/m^2 a été étudiée par les courbes exponentielle d'inactivation (Fig.5). La méthode biologique de denombrement des phages dans la culture bactérienne a été appliquée.

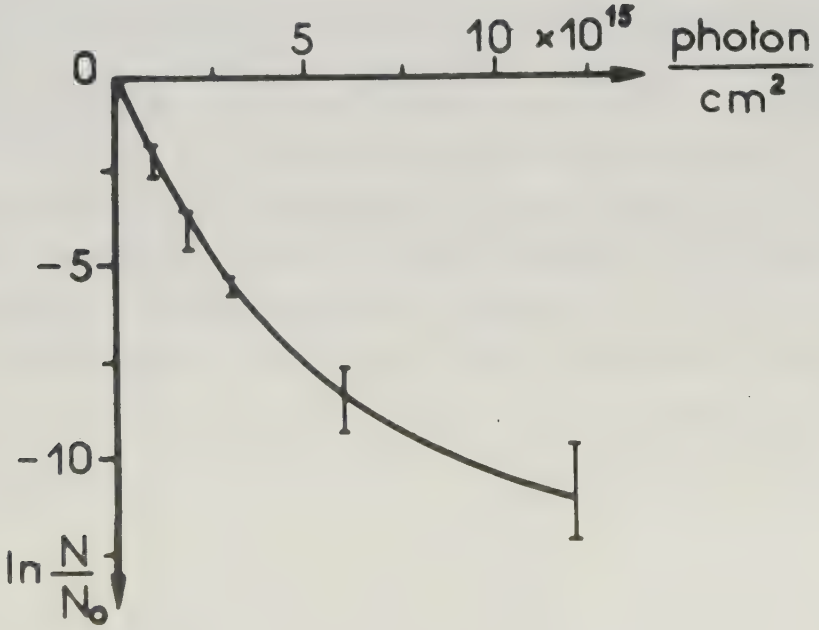


Fig. 5 : Inactivation du bactériophage T7
(No, N : nombre des phages actifs avant et après l'irradiation en absence des mécanismes de réparation de la bactérie.).
(D'après Rontó et al, 1967).

Un modèle utilisant les paramètres de la courbe d'inactivation (Fig. 5) et le nombre des sites dimérisables et hydrolysables de la séquence de l'ADN (Rontó 1979) a été établi pour des petites doses d'inactivation du phage T7. Ce modèle détermine les sections efficaces "in situ" pour la dimérisation (σ_d), la photoreversion (σ_r) et l'hydratation (σ_h) des bases pyrimidiques. La méthode a été appliquée aussi pour les phages MS-2 et ΦX-174. La comparaison des sections efficaces déterminées (Tableau III) montre que la phage T7 est mieux protégé contre les photo-altérations, ce qui est dû probablement à son ADN hélicoidal et bicaténaire.

TABLEAU III

	Section efficace (cm^2/sites susceptibles)		
	σ_d	σ_t	σ_h
T7:ADN bicaténaire hélicoidal	10^{-19}	10^{-16}	-
MS-2:ARN,monocaténaire appairé en 85%	10^{-19}	10^{-17}	10^{-19}
OX-174 : ADN monocaténaire	10^{-18}	10^{-16}	-

Les sections efficaces permettent de déterminer le nombre des photones absorbés. On peut donc exprimer l'inactivation du phage en fonction du nombre des photoproduits. Ainsi, il apparaît qu'un dimère est déjà suffisant pour altérer le fonctionnement du phage T7.

CHAPITRE III

ACTIVITE OPTIQUE DES ACIDES NUCLEIQUES

3.1. GENERALITE

L'activité optique est une propriété des molécules dûe à la présence d'une dissymétrie qui peut être la dissymétrie de la molécule où la dissymétrie de l'arrangement spatial des molécules.

Le milieu actif est doué de pouvoir rotatoire : il a différents indices de réfraction pour les deux vibrations circulaires en lesquelles une lumière incidente polarisée rectilignement peut être décomposée : gauche et droite.

Cette différence des indices de réfraction entraine une rotation α du plan de polarisation. Cette rotation dépend de la longueur d'onde.

Dans le cas où le composé étudié présente une bande d'absorption à λ_o, la courbe de dispersion de α a l'allure donnée dans la figure 6 : c'est une courbe centrosymétrique dont le point d'inflexion est à λ_o.

Historiquement la plupart des composés étudiés initialement, absorbaient dans l'ultra-violet (sucres, acides...) régions alors inaccessible. Ainsi la plupart de courbes de dispersion étaient limitées à la partie monotone n'attaignaient pas le premier extrenum. Dans ces conditions il n'est pas étonnant que les premières lois donnent la variation de α en fonction de λ n'aient décrit que cette partie.

- loi de Fresnel $\alpha \simeq \frac{\Pi}{\lambda} (n_g - n_d)$ où λ est la longueur d'onde de la lumière incidente, n_g et n_d sont les indices de réfraction pour les deux composants de cette lumière.
- loi de Biot $\alpha = \frac{\Delta}{\lambda^2}$
- loi de Drude enfin $\alpha \simeq A/(\lambda^2 - \lambda_o^2)$

  qui introduisent la longueur d'onde λ_o de l'absorption située dans l'U.V.
- En fait l'expression exacte est $\alpha(\lambda) \sim e^{-y^2} \int_0^y e^x dy$

  où $y = \frac{\lambda \quad \lambda_o}{\Delta o}$

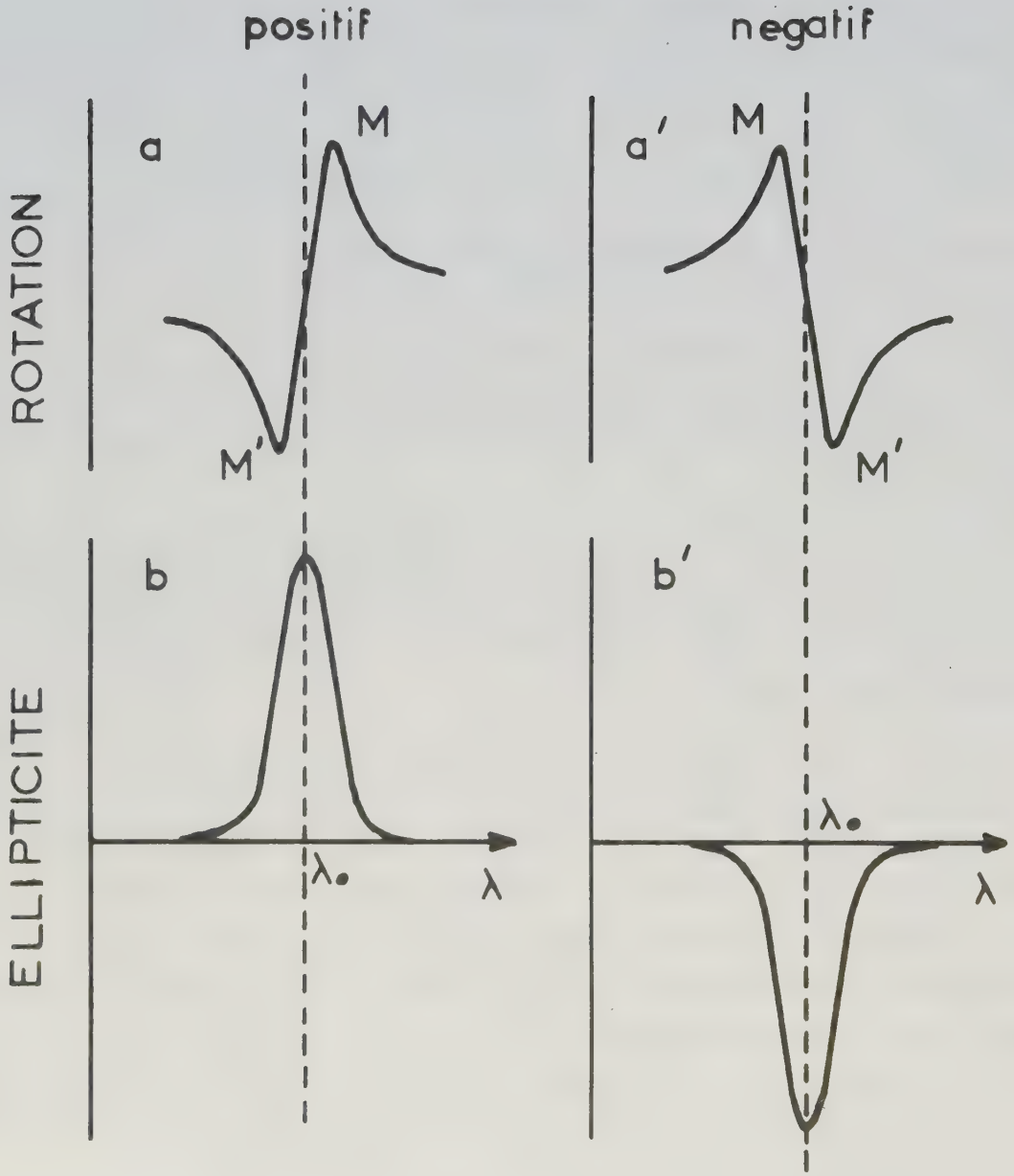


Fig. 6 : L'effet Cotton idéalisé
a, b : ROD.et D.C. de l'effet Cotton positif
a',b' : ROD. et D.C. de l'effet Cotton négatif.
(D'après Yang et al, 1969).

Si le milieu actif est absorbant, les deux vibrations circulaires de sens inverse, qui se propagent avec des vitesses différentes, peuvent également subir des absorptions différentes ; on dit que le milieu présente le phénomène de dichroisme circulaire (D.C.). Les deux vibrations circulaires égales donnent alors, après la traversée du milieu actif absorbant, deux vibrations d'amplitudes inégales dont la résultante est une vibration élliptique. Dans le cas idéalisé (Fig. 6b) ou la molécule ne possède qu'une bande d'absorption, l'expression du dichroisme circulaire qui accompagne la rotation à l'intérieur de cette bande montre que l'ellipticité, nulle à l'extérieur de la région d'absorption, passe par un maximum à une longueur d'onde λ proche de la longueur d'onde de la maximum de l'absorption λ_o (Moffitt et Moscovitz, 1959).

Sur la Fig. 7 sont présentées les variations des indices de réfraction (a) et d'extinction (b) dans la région d'absorption.

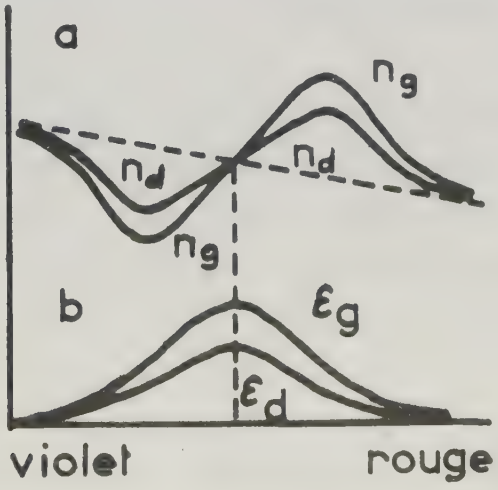


Fig. 7

En comparant les courbes de Fig. 7 a et b, et Fig. 6a et b, on rattache facilement les deux groupes de phénomènes l'un à l'autre en remarquant que la rotation et l'ellipticité mesurent respectivement des différences entre les indices de réfraction et l'extinction de deux vibrations circulaires inverses.

L'ensemble de deux phénomènes : la dispersion optique rotatoire au voisinage d'une bande d'absorption et le dichroisme circulaire porte le nom d'effet Cotton.

L'effet Cotton peut être positif (Fig. 6a et b) ou négatif (Fig. 6 a' et b') déterminé par la dissymétrie de la molécule. En outre les molécules peuvent avoir plusieurs effets Cotton avec des signes différents.

Le phénomène d'activité optique peut être expliqué par les transitions électroniques au cours de l'absorption.(Bayley 1973), Pendant une transition de l'état fondamental à l'état excité la redistribution de la densité électronique peut s'effectuer de deux manières :

1. un déplacement linéaire de la charge électronique caractérisé par un dipole électrique ($\vec{\mu}_e$) qui détermine la force de dipole (D) d'une transition électronique, $D \sim |\vec{\mu}_e|^2$

2. une rotation de la charge autour d'un axe caractérisée par un moment magnétique le long de l'axe de rotation ($\vec{\mu}_m$).

La force de rotation d'une transition active est déterminée par le produit scalaire de deux dipoles vectoriels

$$R \sim \vec{\mu}_e \cdot \vec{\mu}_m$$

L'activité optique se manifeste lorsque ces deux vecteurs possèdent des composantes parallèles. Par exemple : un déplacement hélicoidal d'une charge électronique peut engendrer les vecteurs $\vec{\mu}_e$ et $\vec{\mu}_m$, parallèles ou antiparallèles, qui donnent lieu à un effet Cotton positif ou négatif.

3.2. ACIDES NUCLEIQUES

Les chromophores des macromolécules biologiques se trouvent généralement dans un environnement dissymétrique et ainsi possèdent l'effet Cotton. L'étude de leur activité optique (par D.O.R. et D.C.) fournit de l'information sur l'environnement des chromophores et la conformation de la macromolécule. L'activité optique des acides nucléiques est très sensible aux interactions des bases nucléiques et à leur géométrie. Des études expérimentales sur un grand nombre des polynucléotides, artificiels et naturels, ainsi que des calculs sur les modèles de polymères ont apporté de l'information sur les différentes conformations des acides nucléiques (Buch, 1971 ; Brahms, 1971 ; Tinico, 1979).

Les bases nucléiques isolées sont planes et par conséquent n'ont pas d'activité optique.

Les bases de mononucléosides et mononucléotides se trouvent dans le champ asymétrique des sucres d'où provient leur effet Cotton simple, relativement faible (Emerson, et al., 1967 ; Buch, 1971). La position et l'amplitude de cet effet Cotton est determinée, d'une part par les bases mêmes : chez les composés naturels on observe un effet Cotton négatif pour les dérivées puriques et positif pour les dérivées pyrimidiques. D'autre part c'est la forme stérique du sucre (β- ouα-) et non pas sa nature qui détermine aussi l'activité optique : en remplaçant β-ribose (ou β-dextrose) avec α-ribose (ou α-dextrose) le signe de l'effet Cotton se renverse immédiatement (Yang et al., 1966) ; par contre on observe pas de différences si on échange le ribose avec le dextrose.

Les polynucléotides possèdent un effet Cotton multiple qui se caractérise par deux ou plusieurs maxima et minima.

L'origine électronique de l'effet Cotton multiple est expliquée par la théorie de Tinoco (1968). Il considère que l'activité optique des polynucléotides est due aux interactions qui ont lieu au cours des transitions électroniques. Les interactions les plus importantes sont au nombre de deux :

1. interaction du type exciton : $\lambda_{abs} \sim$ 260nm,
   transition $\Pi \rightarrow \Pi^*$

La théorie des excitons explique les propriétés optiques des polynucléotides, composés de bases identiques. Un quantum d'énergie n'est pas absorbé seulement par une base mais il migre et excite toutes les autres bases. Le transfert d'énergie d'excitation de base en base s'effectue par résonance. Ainsi lorsque les bases se trouvent dans une conformation hélicoidale on arrive par résonance, à la formation d'un état collectif excité (exciton), qui enveloppe des états très proches en énergie. Les transitions de l'exciton déterminent l'activité optique des polynucléotides. En D.C. cette situation s'exprime par la présence d'un doublet dichroique antisymétrique de deux bandes, presque identiques, avec des signes opposés et un point de renversement autour du maximum d'absorption (Fig. 8a) . Dans ce cas la somme

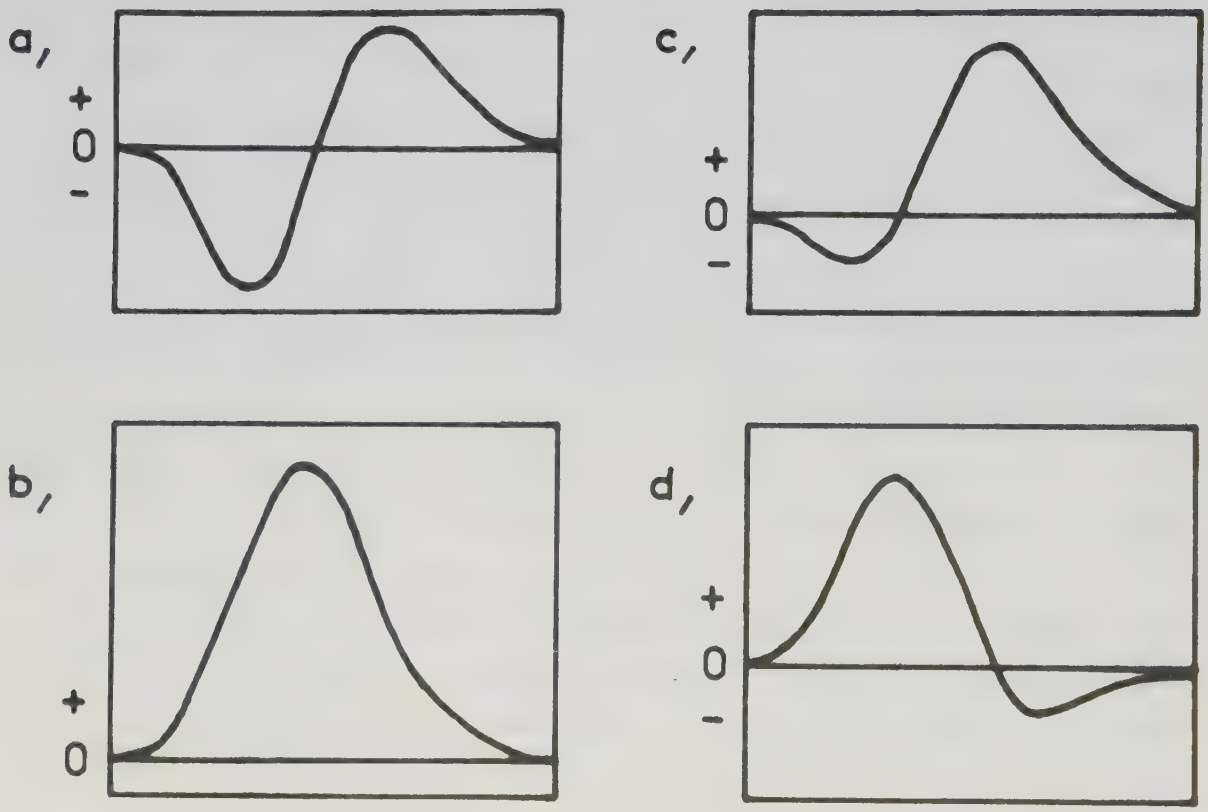


Fig. 8 : Courbes théorique de D.C.
a : Spectre "non-conservatif
b : spectre "conservatif"
c et d : superpositions des spectres conservatifs et non-conservatifs.
(D'après Yang et al, 1969)

des forces de rotation des deux bandes est zéro. Ce type de spectre est nommé "conservatif" (Buch et Brahms, 1967).

2. Interactions qui donnent des spectres D.C. du type "non conservatif".

On observe de tels spectres lorsque les bandes D.C. de la région d'absorption de 200-300 nm entrent en interaction avec les états excités d'une absorption dans l'UV lointain. La somme des forces de rotation des différentes bandes dans une région spectrales limitée, n'est pas zéro pour les spectres non-conservatifs (Fig. 8b).

Les deux types d'interactions se manifestent à des degrés différentes dans le cas réels. Alors les spectres de D.C. sont composés par des spectres conservatifs et non-conservatifs (Fig.8 c,d). L'interprétation de pareils spectres est liée à la géomrie de la molécule : la distance et la rotation entre les bases successives, l'inclinaison du plan des bases par rapport à l'axe de la molécule ainsi que l'orientation des sucres dans le squelette (Yang et al,1969).

L'activité optique des acides nucléiques naturels, ARN et ADN, est très différente.

Les spectres D.C. d'ARN, de différentes origines, sont tous du même type "non-conservatif", caractérisés par une bande positive intense dont le maximum est très proche du maximum d'absorption (Fig.9). Parfois, on peut observer de très faibles bandes négatives situées des deux côtés du maximum (Brahms et al, 1964). On constate de très petites différences entre les spectres d'ARN monocaténaire et bicaténaire (Oriel et al,1967, Yang et al. 1969).

Les spectres de D.C. d'ADN, de différentes origines montrent un effet Cotton double, avec des signes opposés et un point de renversement proche du maximum d'absorption. Le rapport de l'intensité des bandes positives et négatives (la conservativité du spectre) varie selon la composition et la conformation de l'ADN.

On connait trois différentes conformations d'ADN bicaténaire : A,B,C (Arnott, 1970). Ces trois conformations donnent trois différents spectres de D.C. (Fig. 10) (Tunis-Schneider et al, 1970, Sprecher et al 1978). En utilisant les paramètres géométriques de ces trois formes d'ADN, déterminés par diffraction des rayons X (Cech et Tinoco , 1977) ont effectué des calculs sur des modèles. Leurs résultats sont très proches des spectres expérimentaux (Fig.10). Les spectres d'ADN monocaténaire et bicaténaire ne sont pas très différents.

On a cherché à expliquer la grande différence entre les spectres D.C. d'ADN et d'ARN. Il est evident qu'une différence entre les structures monocaténaires et bicaténaires ne peut pas en être la cause. (Yang et al, 1969), Langridge et al (1964), ont observé que la présence d'uracile dans l'ARN n'est pas déterminante non plus. Aujourd'hui on accepte l'hypothèse de Yang et al, (1969) que la présence ou l'absence du groupement 2'-hydroxyle dans la molécule de pentose, qui détermine l'orientation du sucre, influence la géométrie des bases, leur empilement et par conséquent l'activité optique de l'acide nucléique. La distance entre les bases dans leur empilement semble responsable de l'effet d'hypochromisme qu'on observe au cours de l'absorption des acides nucléiques. En plus l'étude de l'activité optique peut aussi être utile pour avoir une information sur la rotation et l'inclination des bases empilées (Buch, 1971, Cech et Tinoco,1977).

Les caractéristiques de l'activité optique des complèxes de nucléoprotéines (chromosomes, virus) sont en général beaucoup plus compliquées que celles de leurs composantes, étudiées séparement. Il est difficile de déterminer les facteurs responsables de ce phénomène mais il est évident que d'une part, les bandes actives de l'absorption des protéines et des acides nucléiques peuvent se superposer et, d'autre part, la présence des protéines peut influencer considérablement la conformation des acides nucléiques.

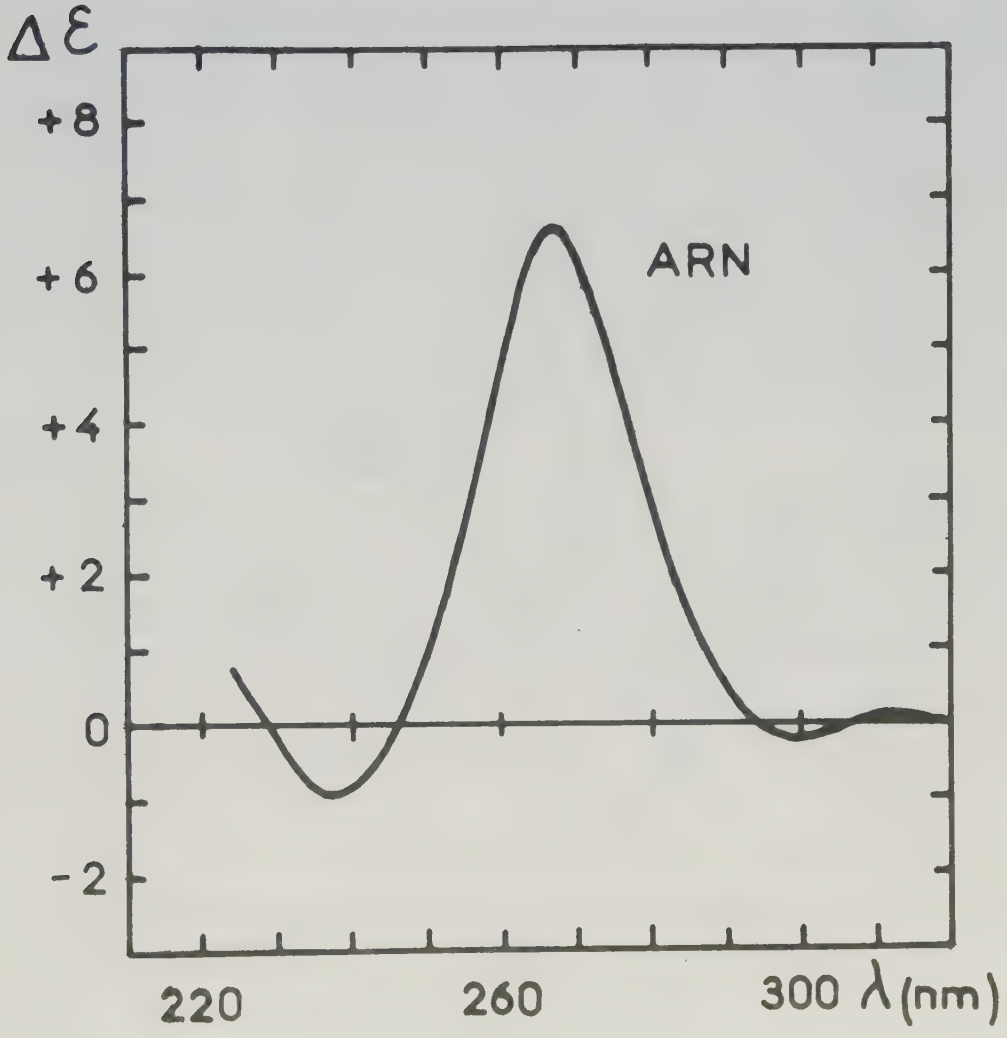


Fig. 9 : Spectre de D.C. de l'ARN
(D'après Brahms 1971)

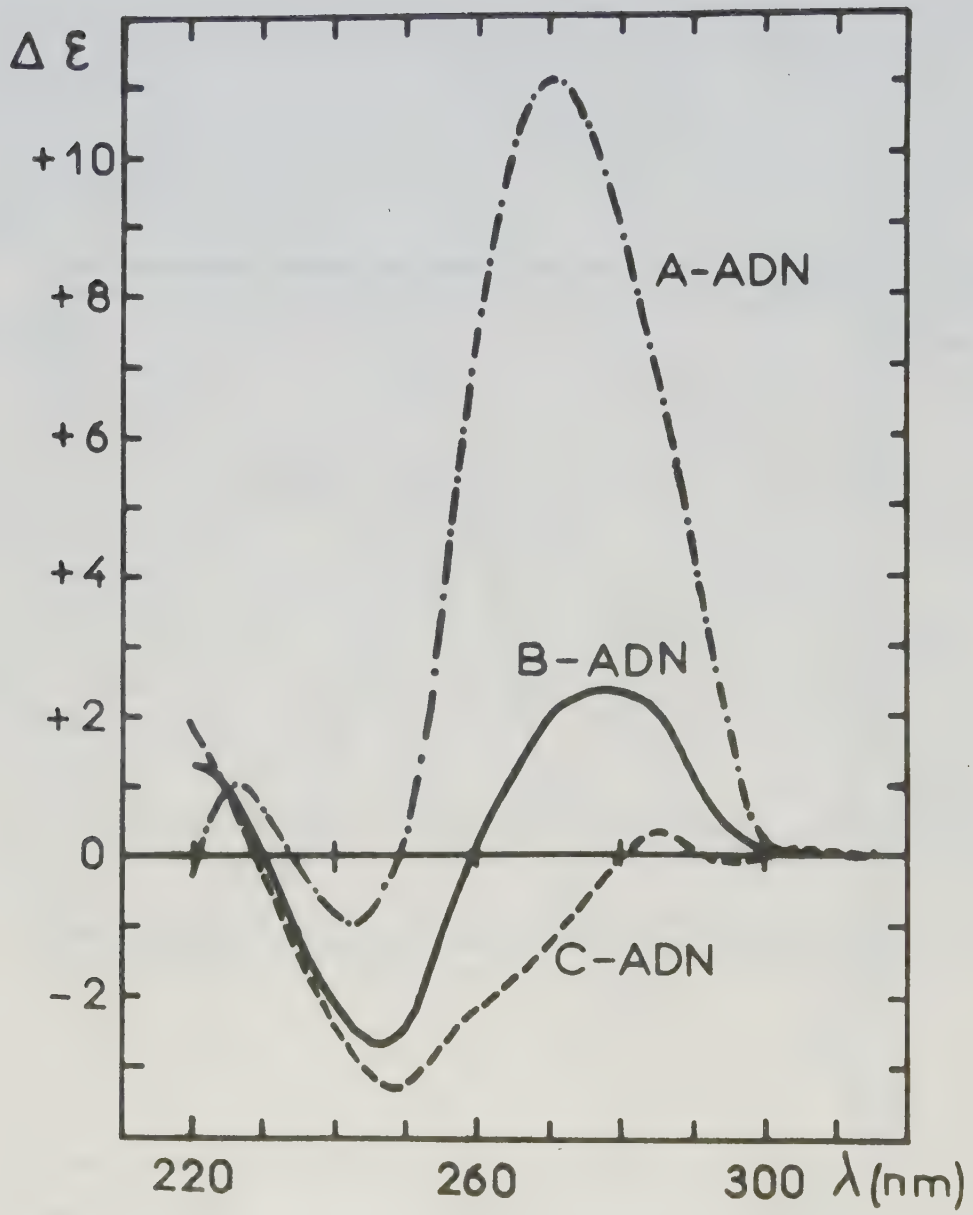


Fig. 10 : Spectres de D.C. de l'ADN en différentes conformations (D'après Sprecher et al 1978).

CHAPITRE IV

MATERIEL ET METHODES

4.1. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les cultures des bactériophages ont été préparées selon la méthode de Strauss et Sinsheimer (1963) en utilisant le tampon "M9". La composition de ce tampon est : 0,13 g $MgSO_4$; 1g NH_4CL ; 3g KH_2PO_4 ; 6g Na_2HPO_4 x $2H_2O$ dans 1 litre d'eau distillée. Il a l'avantage d'être suffisemment simple pour être optiquement pur et en même temps de servir de milieu physiologique vis-à-vis des phages et de l'ADN. L'Escherichia-Coli-B sert comme bactérie-hôte au phage T7 et l'Escherichia-Coli-C aux phages MS-2 et ΦX-174. Les conditions déterminées par Gáspár, Rontó, Müller (1979) permettent d'optimaliser le processus de multiplication des phages.

La purification des lysats a été effectuée en plusieurs étapes :

Les phages T7 et MS-2 ainsi que toutes les particules protéiques du lysat, ont été précipités à l'aide de $(NH_4)_2SO_4$, très concentré (300 g/l). La précipitation du phage ΦX-174 a été effectuée par centrifugation en utilisant la centrifugeuse Beckman J-21, avec le rotor JCF-2 et 17000 t/min. Les acides nucléiques libres ont été éliminé avec le surnageant et les culots homogénisés en tampon Tris.

Le lavage des phages effectué par nombreus cycles de centrifugation permet d'éliminer les impuretés bactériennes plus grandes que les phages. Les vitesses utilisées (5-8000 t/min pour T7, 8-12000 t/min pour ΦX-174 et 10-12000 t/min pour MS-2) ne provoquent pas la précipitation des phages.

Après le lavage, les mêmes procédures de précipitation décrites ci-dessus ont été répétées afin d'obtenir le volume nécessaire pour l'ultracentrifugation. Cette dernière a été effectuée avec la centrifugeuse Beckman-Spinco L2-75, rotor Ti60. Les phages T7 ont été soumis pendant 1 heure à 30000 t/min, les phages ΦX-174 et MS-2 pendant 2 heures à 45000 et 50000 t/min respectivement.

Les impuretés plus petites que les phages étant éliminées avec le surnageant, le sédiment a été resuspendu en tampon Tris. Le lavage des phages ainsi purifiés a été effectué par trois cycles de centrifugation. Après, les suspensions ont été mises en gradient de CsCI et soumis à une deuxième ultracentrifugation : avec le rotor Sw-41 pour le phage T7 pendant 2 heures à 33000 t/min ; avec le rotor Sw-60 pour les phages MS-2 et ΦX-174 pendant 4 heures à 45-50000 t/min. Les couches de phages qui se distinguent bien sur le gradient de CsCI ont pu être séparés. Pour éviter des agrégations et des changements de structure des phages dûs à la présence de CsCI, les suspensions (tampon "M9") ont été dialysées trois à cinq fois à travers d'un filtre Amicon et diluées jusqu'aux concentrations convenables pour études optiques (densité optique 0,5 - 1).

L'ADN du phage T7 a été isolé par l'extraction en phénol selon la méthode de Mandell et al. (1960). Ensuite, il a été précipité en éthanol et resuspendu en tampon "M9" juste avant l'utilisation.

La concentration des phages et de l'ADN a été déterminée par l'absorption à λ = 260 nm en tenant compte du contenu phosphorique des acides nucléiques, (Davison et Freifelder 1962, Strauss et Sinsheimer 1963) de leur coefficient d'extinction à l'état isolé et "in situ", ainsi que de la contribution de la diffusion de la lumière à l'absorption (voir chap. 3.2.).

L'irradiation UV des bactériophages a été effectuée par une lampe germicide (Général Electric) : P = 15 w et λ = 254 nm. La dose reçue par l'échantillon a été estimée à 3×10^{16} photons/cm^2 (Ronto, 1967).

Tous les échantillons ont été préparés à l'Institut de Biophysique de l'Université de Médecine à Budapest, où ont été d'ailleurs effectués plusieurs études par différentes méthodes dont les résultats sont déjà résumés dans le chap. 1.3.1. et 1.3.4.

4.2. ABSORPTION UV.

L'absorption de la lumière par une solution diluée est exprimée par la loi de Lambert-Beer :

$$A(\lambda) = \log I_o/I = \varepsilon/\lambda c\ 1$$

où $A(\lambda)$: absorption

I_o et I : intensité de la lumière incidente et transmise

$\varepsilon(\lambda)$: coefficient d'extinction moléculaire.

c : concentration molaire de la solution

l : épaisseur (cm) de la cuve.

Les spectres d'absorption des phages ont été enregistrés en utilisant le spectrophotomètre Perkin-Elmer 200 à deux faisceaux : l'un qui passe par l'échantillon et l'autre par la référence (le tampn "Mg"). La sensibilité de l'enregistrement est de l'ordre de 10^{-2} unité d'absorption,nm. La précision avec laquelle on mesure λ est 1nm, et 1-2% pour la densité optique. Des cuves identiques de quartz suprasil ont été utilisées pour l'échantillon et pour la référence.

Lorsque l'absorption est accompagnée d'une diffusion de la lumière, on observe une augmentation du maximum d'absorption et une distortion du spectre. Les bactériophages diffusent la lumière à cause de leur dimensions, comparables aux longueurs d'ondes de la lumière utilisée. Cela impose une correction des spectres enregistrés. A cette fin deux méthodes ont été utilisées :

a) correction par extrapolation, convenable pour les petits phages MS-2 et ΦX-174. Elle repose sur la supposition que l'intensité de la lumière diffusée est une fonction monotonne de la longueur d'onde

$$I_{diff}(\lambda)/I_o = k.\lambda^{\alpha}$$

où k et α ne dépendent pas de λ . Les valeurs de k et α peuvent être déterminées dans le domaine de la transparence (dans notre cas λ>320nm). Par l'extrapolation on détermine l'intensité de la diffusion dans la région de l'absorption.

b) à la base d'une étude (Tŏth, 1979) nous sommes arrivés à la conclusion que pour le phage T7, plus grand que les phages MS-2 et ΦX-174, l'équation (2) n'est plus utilisable. Une méthode semi-expérimentale a été élaborée (Tŏth, 1979) où l'approximation de Rayleigh-Gans a été utilisée dans la forme simplifiée :

$$I_{diff}(\lambda)/ {}_o = k.I_{90°}(\lambda).F(a/\lambda)$$

où $I_{diff}(\lambda)$: intensité totale de la lumière diffusée

$I_{90}(\lambda)$: intensité de la lumière diffusée sous l'angle $\theta=90°$

$F(a/\lambda)$: facteur qui dépend du rapport entre la dimension des particules diffusantes (a-rayon du phage) et la longueur d'onde de la lumière. Il peut être déterminer lorsque on connait la géométrie des particules.

k : constante dont la valeur est choisie en ajustant les courbes de diffusion avec les courbes d'absorption dans le domaine de transparence ($320nm<\lambda<400nm$).

Une fois les corrections effectuées on peut calculer les coefficients d'extinction molaire $\varepsilon(\lambda)$ du chromophore primaire : une base nucléique moyenne :

$$\varepsilon(\lambda)=A_{cor}(\lambda).c^{-1} ; l^{-1}$$

où $A_{cor}(\lambda)$: absorption corrigée

c : : concentration molaire des bases nucléiques

l : : épaisseur (cm) de la cuve

Les spectres d'absorption donnent les coefficients moyens d'extinction molaire du chromophore en fonction de la longueur d'onde.

4.3. DICHROISME CIRCULAIRE

Le dichroisme circulaire (D.C.) d'une solution présente la différence ($\Delta\varepsilon$) entre les coefficients d'absorption de la lumière polarisée circulairement à gauche (ε_g) et à droite (ε_d)

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_g - \varepsilon_d$$

Les spectres de D.C. des bactériophages T7, MS-2 ΦX-174 et l'ADN, isolé du phage T7, ont été enregistrés avec le dichrographe III de Jobin-Yvon, qui donne la déviation d(mm) du signal électrique dû à l'absorption différentielle en fonction de la longueur d'onde. La relation entre d et D.C. est la suivante :

$$\Delta\varepsilon = \sigma.d/|.c$$

où σ : sensibilité de l'appareil
$|$: épaisseur de la cuve (cm)
c : concentration molaire de la solution

La sensibilité maximale de l'appareil est de 10^{-6} unité d'absorption par

La concentration des solutions a été $\sim$ 0,1 mg/ml, pour les phages et l'ADN. L'épaisseur des cuves en quartz suprasil a été de 0,1 - 1 cm. Le dichrographe ayant un seul faisceau, le spectre du tampon a été enregistré avec les mêmes cuves et les mêmes sensibilités, comme celles des échantillons. Les différences entre les deux spectres ont été calculés. La précision avec laquelle λ a été mesurée est de 1nm et l'incertitude sur la mesure de d n'a jamais été inférieure à 5%.

Pour diminuer la diffusion différentielle, l'effet de la distance entre la cuve et le détecteur a été étudié et une position favorable a été choisie. Cette précaution n'étant pas suffisante (Latimer 1972, Holzwarth et al 1974) dans l'interprétation les spectres sont considérés comme non corrigés.

4.4. LA DENATURATION THERMIQUE DU PHAGE T7.

L'absorption UV et le D.C. sont deux paramètres optiques sensibles aux changements de la conformation de l'ADN. Nous les avons utilisés pour étudier la dénaturation thermique de l'ADN du phage T7 ("in situ").

4.4.1.Absorption UV.

L'étude a été effectuée sur un spectromètre Perkin-Elmer 200 à λ = 260nm. La cellule avec l'échantillon et celle de référence ont été chauffées par un système d'eau circulante, dont la température monte linéairement avec 0,4°C/min. La température de l'échantillon a été déterminée par un thermocouple en cuivre-constantan. Les densités optiques et les températures correspondantes ont été enregistrées par un système qui comprend un convertisseur analogique-digital, lié à un ordinateur EMG 666. Ce dernier calcule les premières dérivées. Les valeurs de la température ont été déterminées avec une précision de ± 0,05°C.

4.4.2. Dichroisme circulaire (D.C.)

Le Dichrographe de Jobin-Yvon III a été utilisé. La cellule de l'échantillon a été chauffée de la même manière que pour l'étude précédente (3.4.1.). La température monte à raison de 0,5 - 1°C/min. Le dichrographe donne les valeurs du D.C. en fonction du temps. Les températures ont été déterminées avec une précision de ± 0,25°C. A partir de ces valeurs les premières dérivées ont été calculées.

CHAPITRE V

RESULTATS ET DISCUSSIONS

5.1. ETUDE DES BACTERIOPHAGES T7, ΦX-174 et MS-2 PAR ABSORPTION U.V. ET D.C..

Sur la Fig. 11 : a, b,c sont présentés les spectres d'absorption UV (---), corrigés pour la diffusion de la lumière, et les spectres de D.C. (——) des phages : T7 ΦX-174 et MS-2. Pour pouvoir comparer les propriétés optiques de leurs acides nucléiques, dont les conformations sont différentes, les valeurs de (ε) et ($\Delta\varepsilon$) ont été exprimées par des coefficients moyens d'extinction molaire des bases. Les quantités et les types des protéines étant différents, les spectres ne peuvent pas être comparés pour la région où l'absorption des protéines est prédominante.

5.1.1. Spectres d'absorption UV (Fig. 11 (-----).

Ces spectres sont similaires et se caractérisent par une bande large entre 300-240nm avec un maximum à $\lambda \sim 260$nm et un minimum à $\lambda \sim 240$nm suivi d'une forte augmentation vers les longueurs d'ondes les plus courtes.

La bande d'absorption autour de $\lambda \sim 260$nm est attribuée aux bases nucléiques, puisque leur coefficient d'extinction moléculaire dans cette région est de 10 à 20 fois plus grande que celle des protéines (Patrick, 1976) et l'absorption de leurs autres composants (les sucres et les phosphates) est très faible. Cette bande d'absorption correspond à la transition électronique Π-Π^* des bases hétérocycliques (Clark, Tinoco, 1965).

Les observations suivantes sont à noter :

1) Le maximum de la bande d'absorption atteint différentes valeurs pour les trois phages :

$(\varepsilon)_{260}$: $7{,}3 \times 10^3$ $M^{-1}cm^{-1}$ pour le phage T7

$7{,}5 \times 10^3$ ΦX-174

$8{,}0 \times 10^3$ MS-2

Si on compare ces valeurs avec les valeurs de $(\varepsilon)_{260}$ des

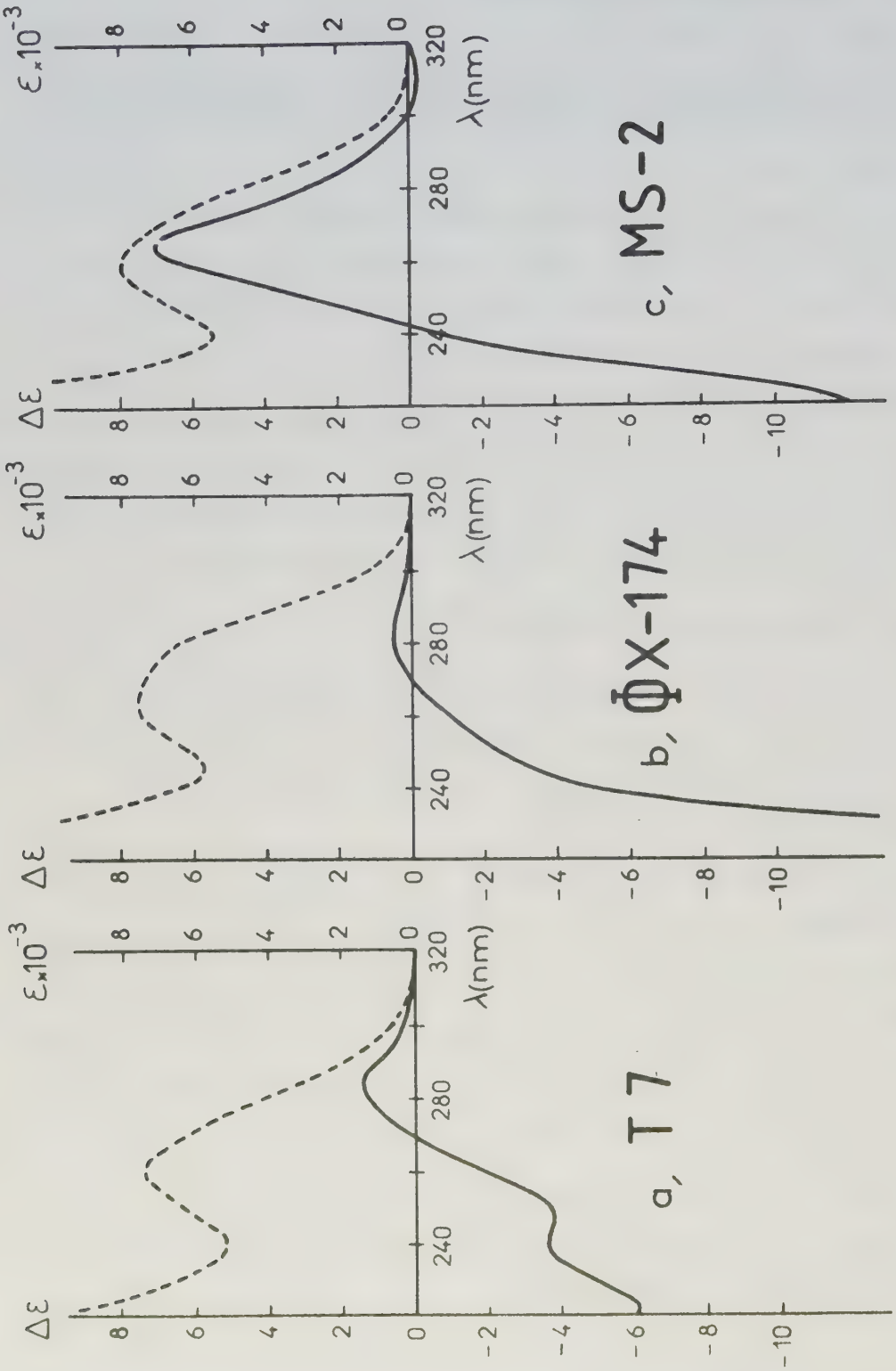


Fig. 11 : Spectres d'absorption (---) et de D.C. (-) des bactériophages T7 (a), Φx-174 (b) et MS-2 (c) (en tampon "M9", pH=7, 0,IM Nacl T = 25°C).

Le doublet dichroique centrosymétrique possède une nette bande positive dont le maximum est situé à λ=285nm et une bande négative avec son minimum négatif à λ=247nm. Ce doublet se présente aussi comme asymétrique : la valeur absolue du minimumnégatif est plus de deux fois supérieure à celle du maximum de la bande positive.

Le spectre de D.C. du phage ΦX-174 (Fig. 11, b) est caractérisé aussi par une bande positive (λ_{max}=280nm). Elle est environ trois fois moins intense ($\Delta\varepsilon_{280}$=0,56 $M^{-1}cm^{-1}$) que celle du phage T7 ($\Delta\varepsilon_{285}$ = 1,47 $M^{-1}cm^{-1}$).

On voit aussi le début de la partie négative du doublet dichroique mais le reste de cette partie est masqué par la deuxième bande négative, beaucoup plus forte que celle du phage T7. L'allure du spectre fait supposer ici aussi une asymétrie de l'effet Cotton double.

Les bandes positives des spectres nous informent sur les acides nucléiques des deux phages. Le maximum plus élevé de la bande du spectre de D.C. du phage T7 indique que les interactions entre les bases de son ADN bicaténaire devraient être différentes de celles entre les bases de l'ADN monocaténaire du phage ΦX-174, dont le maximum est environ trois fois moins intense. Cela est en accord avec les théories de l'activité optique des polynucléotides (Chapitre III).

5.1.2.2. Spectres de D.C. du phage à ARN :MS-2 (Fig.11:c)

Le spectre D.C. du phage MS-2 montre, dans le domaine de l'activité optique de l'acide nucléique, une large bande positive dont le maximum est situé à λ=265nm, très proche du maximum de l'absorption ($\lambda \sim$ 260nm). Cette bande est beaucoup plus intense ($\Delta\varepsilon_{265}$=7 $M^{-1}cm^{-1}$) que les bandes positives dans les spectres de D.C. des phages à ADN (Fig.11 : a,b). Par ses profils et amplitudes elle est comparable au spectre de D.C. de l'ARN isolé (Fig. 9) ce qui indique qu'il n'y a pas de très grands changements dans les interactions entre les bases de l'ARN isolé et l'ARN "in situ".

différents nucléotides ($8,1 \times 10^3$-$14,9 \times 10^3$) et des bases isolées en solution ($6,1 \times 10^3$-$13,^4 \times 10^3$), (Buch 1971, p. 360 et références dedans), on constate que les valeurs de $(\varepsilon)_{260}$ des acides nucléiques dans les phages sont plus petites que celles des nucléotides et des bases isolées. Cet effet connu sous le nom d'hypochromisme s'explique par des interactions entre les bases ou les pairs de bases succéssives, dues à leur empilement. L'hypochromisme peut être influencé par des facteurs tels que la séquence des bases, la force ionique, l'hydrophobicité du milieu (Patrick, 1976)

Nos résultats montrent que l'hypochromisme est différent pour les trois phages mais ce phénomène est le plus prononcé sur le spectre du phage T7 dont l' ADN est bicaténaire.

2) La largeur et le profil des bandes d'absorption sont différents pour les trois phages.

Les deux paramètres, la largeur et le profil des bandes d'absorption, dépendent de la séquence et de la structure fine des transitions électroniques des bases (Hug et Tinoco, 1973,) et sont également influencés par l'absorption des protéines (autour de 290nm). Il est difficile de séparer ces deux effets. Ainsi nous ne sommes pas en mesure d'interpréter les différences observées sur nos spectres.

3) L'absorption des bases nucléiques au-dessous de 230nm est superposée à celle des protéines dans les trois cas.

5.1.2. Spectres de D.C. (Fig. 11 (——)

Le caractère de ces spectres dépend du type d'acide nucléique : ADN ou ARN.

5.1.2.1. Spectres de D.C. des phages à ADN : T7 et X-174 (Fig.11(a et

La Fig.11:a) présente le spectre de D.C. du phage T7. Il se compose de deux parties : un doublet dichroique centrosymétrique avec un point de renversement autour de λ = 268nm, attribué à l'activité optique de l'ADN (chapitre III) et une deuxième bande négative au-dessous de λ = 240nm due surtout à l'activité optique des protéines et, dans un degré plus faible aussi à l'ADN.

Au-dessous de λ=243nm le spectre possède une forte bande négative due surtout, comme pour les phages à ADN, à l'activité optique des problèmes. On note aussi la présence d'une bande négative très faible (point de renversement à λ=310nm). Elle peut être expliquée par une transition $n \rightarrow \Pi^*$ des bases (Yang et al, 1969) bien qu'une contribution des protéines et de la diffusion différentielle ne soit pas exclue.

Les paramètres qui caractérisent les spectres de D.C. des trois phages ont été rassemblés dans le tableau IV.

Tableau IV.

Tableau IV : Caractéristiques des spectres de D.C. des trois phages.

	T7	ΦX-174	MS-2
Minimum négatif	—	—	λ= 310 nm Δε∿-0,015
Point de renversement	—	—	λ= 300 nm
Maximum positif	λ= 285 nm Δε= + 1,47	λ= 280 nm Δε= + 0,56	λ= 265 nm Δε= + 7
Point de renversement	λ= 268 nm	λ= 268 nm	λ= 243 nm
Minimum négatif	λ= 247 nm Δε= - 3,8	—	—
Maximum négatif	λ= 240 nm Δε=-3,6	—	—
Bande négative des protéines	min : λ = 222nm Δε= 6,2	λ<268 nm	λ<243 nm

L'élimination totale de la diffusion de la lumière n'a pas été possible. Ainsi les positions des extrèmums et du zéro ne doivent pas être considérées comme des paramètres exacts. Pour la même raison l'analyse spectrale et les calculs de la force rotationnelle n'ont pas été effectués.

Il est difficile d'attribuer le type des spectres de D.C., en raison du fait qu'on ne peut pas toujours séparer l'activité optique des acides aminés de celle des protéines. Néanmoins on peut constater que les doublets dichroiques chez les phages à ADN sont plus proches du spectre du type "conservatif". L'effet Cotton positif très prononcé dans le spectre du phage à ARN rapproche ce spectre du type "non conservatif" (Fig.8).

5.2. CONFORMATION ET CHANGEMENTS CONFORMATIONNELS DE L'ADN BICATENAIRE "in situ".

5.2.1. Conformation de l'ADN bicaténaire du phage T7

Le doublet dichroique antisymétrique du spectre de D.C. du bactériophage T7 peut être considérée comme étant le spectre de l'ADN "in situ". Nous avons comparé ce spectre avec les spectres de l'ADN bicaténaire isolé étudiés par Tunis-Schneider et al, (1970) et Sprecher et al, 1978). Comme cela a été déjà montré sur la Fig 10 (chapitre III) on distingue trois conformations stables de l'ADN isolé (A,B et C) qui dépendent de la structure secondaire de la molécule.

En faisant la comparaison entre le spectre de D.C. du phage T7 (Fig. 11 :a) et les spectres de la Fig.10, on constate que le spectre de l'ADN "in situ" n'est superposable à aucun des trois spectres de la Fig.10 : A, B et C.

Il peut être situé, par ces paramètres, à une place intermédiaire entre les conformations B et C.

Dans une étude sur le phage T_2 par D.C. Holtzwarth et al (1974) ont trouvé une conformation du type C pour son ADN "in situ".

Par contre Kosturko et al (1979) sont arrivés à la même conclusion que nous : l'ADN "in situ" des phages isomériques T7, P22 et Φcd-1, possède une conformation intermédiaire entre B et C. Ils ont expliqué ce phénomène avec une superhélicité de l'ADN "in situ".

Sussman et Trifonov (1978) ont démontré que la conformation superhélicoidale peut être provoquée dans les nucléoprotéines si

une conformation qui ressemble à B est présente. Les paramètres géométriques de la confirmation superhélicoidale sont très proches des paramètres de la conformation B, mais elle est localement perturbée à cause de l'enroulement de la double hélice autour du noyau protéique cela est confirmé par une étude antérieure du phage T7 à l'aide de la diffraction des rayons X sous grands angles (North et Rich, 1961) où on trouve une conformation B de l'ADN "in situ".

5.2.2. Changements conformationnels de l'ADN 'in situ" étudiés par dénaturation thermique du bactériophage T7.

Les changements de la conformation de l'ADN, "in situ" ont été suivis à l'aide des variations, en fonction de la température, de deux paramètres : le maximum de l'absorption UV (λ=260nm) et une valeur de D.C. très proche du maximum positif (λ=280nm).

Sur la Fig. 12-A sont présentées les courbes de fusion du bactériophage T7, en absorption UV (courbe a) et en D.C. (courbe b). La courbe a a été enregistrée à l'Institut de Biophysique à Budapest où la thermodénaturation du phage T7 a été déjà étudiée par l'absorption (Monaselidze et al, 1978). Dans les deux cas les valeurs A(T) et $\Delta\varepsilon$(T), mesurées à une température donnée, ont été divisées par les valeurs correspondantes à T = 25°C. C'est ce rapport (en %) qu'on présente en fonction de la température :

$$\text{en absorption : } H_A(T) = \frac{A_{260}(T)}{A_{260}(25°C)} \times 100\ (\%)$$

$$\text{en D.C. : } H_{\Delta\varepsilon}(T) = \frac{\Delta\varepsilon_{280}(T)}{\Delta\varepsilon_{280}(25°C)} \times 100\ (\%)$$

$H_s(T)$ et $H_{\Delta\varepsilon}(T)$ présentent les changements du degré de l'hypochronicité des bases nucléiques dans l'ADN par rapport à celles à l'état natif (T_o=25°C), plus les changements dus à la diffusion de la lumière, (les valeurs de $A_{260}(T)$ et de $\Delta\varepsilon_{280}(T)$ n'étant pas corrigées pour ce facteur).

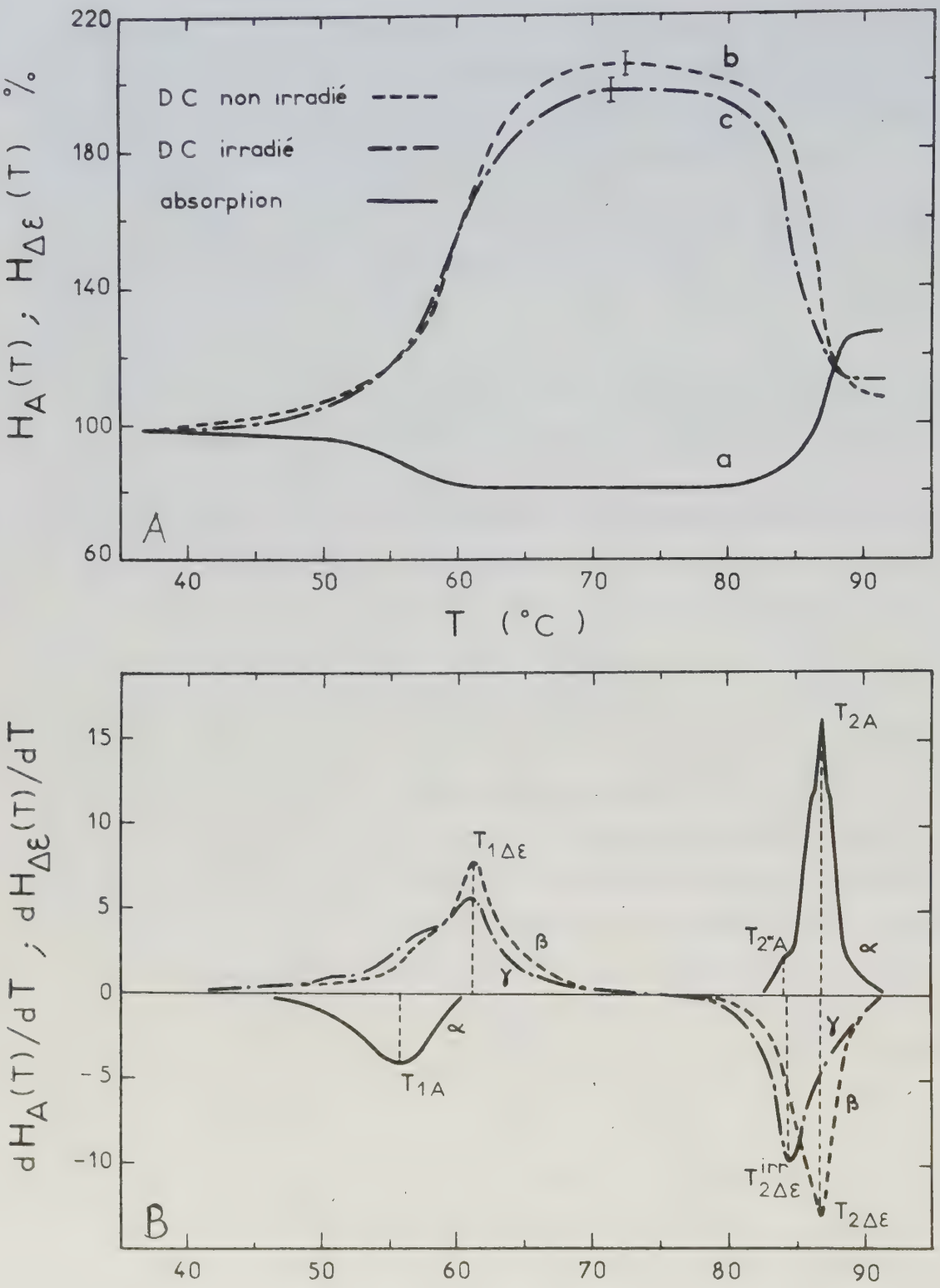


Fig. 12 : Courbes de fusion (A : a,b,c) et leur première dérivée (B : α,B,γ) du bactériophage T7

a, α : en abs. UV (λ=260nm), phage non-irradié

b, B : en D.C. (λ=280nm), phage non-irradié

c, γ : en D.C. (λ=280nm), phage irradié

(selon les conditions décrites dans le chap. 4.4.)

Les courbes de fusion montrent l'existence de deux transitions de l'ADN. Pour déterminer les températures qui caractérisent ces transitions nous avons utilisé les premières dérivées des courbes de fusion qui sont présentées sur la fig. 12.B (α en absorption, β-en D.C.). Les maxima et minima : T_{1A}, T_{2A}, $T_{1\Delta\varepsilon}$ et $T_{2\Delta\varepsilon}$ déterminent les températures des deux transitions.

La première transition est située dans une plage de température, relativement large, elle n'est donc pas très coopérative.

La courbe d'absorption (Fig. 12:a) montre une faible diminution, d'environ 20% entre 45°C et 60°C. Par contre l'activité optique (Fig.12 :b) augmente considérablement, d'environ 108%, entre 50 et 65°C.

Les températures caractéristiques de cette transition (Fig. 12,B) sont les suivantes :

en absorption : $T_{1A} = 56.0 \pm 0,1°C$

en D.C. $T_{1\Delta\varepsilon} = 61,5 \pm 0,25°C$

La transition est irreversible.

La deuxième transition : Elle est située entre 80 et 90° C, et se caractérise par les profils sigmoïdaux des courbes de fusion, qui indiquent la coopérativité de cette transition.

La courbe en absorption montre une augmentation d'environ 50%. La première dérivée de cette courbe (Fig. 12,B) possède une structure fine, le grand maximum (T_{2A}) est accompagné par un maximum plus petit à une température plus basse (T_{2A}^{*}) et par des épaules des deux côtés du grand maximum.

En D.C. (Fig. 12,b.) on observe une forte diminution de l'activité optique dont le niveau final est à proximité du niveau de départ (8%). La première dérivée en D.C. montre un minimum ($T_{2\Delta\varepsilon}$).

Les températures caractéristiques de cette transition sont

en absorption : $T_{2}^{*}{}_{A} = 84,3 \pm 0,1°C$ et

$$T_{2A} = 86,8 \pm 0,1°C,$$

en D.C. $$T_{2\Delta\varepsilon} = 86,75 \pm 0,25° C$$

La transition est reversible au cours du refroidissement lent.

Les deux transitions déterminent trois phases stables de la dénaturation thermique : la première au-dessous de 45°C, la deuxième entre 65°C et 80°C et la troisième au-dessus de 90°C.

Nous avons étudié les spectres de D.C. du bactériophage T7 : dans ces trois phases. Les résultats sont présentés sur la figure 13 où nous avons ajouté aussi le spectre de l'ADN isolé du phage T7. Ce dernier spectre a été enregistré à T = 25°C, puisqu'il ne varie pas jusqu'au début de la transition d'hélice en pelote (T∿80°C)

Ces spectres montrent d'une part un changement de l'activité optique dans la région de la bande positive. Un tel changement a été observé aussi sur la courbe de fusion (Fig. 12A,b). D'autre part il y a des déplacements de position des maxima et minima, des points de renversement ainsi que des modifications du profil des spectres.

Il faut noter que le déplacement du maximum positif de λ=285°C à λ=275°C nous a obligé à choisir une longueur d'onde intermédiaire (λ=280nm) pour étudier la thermodénaturation du phage T7.

Dans le tableau V sont présentées les caractéristiques spectrales du phage T7 pour les trois températures ainsi que celles de l'ADN isolé.

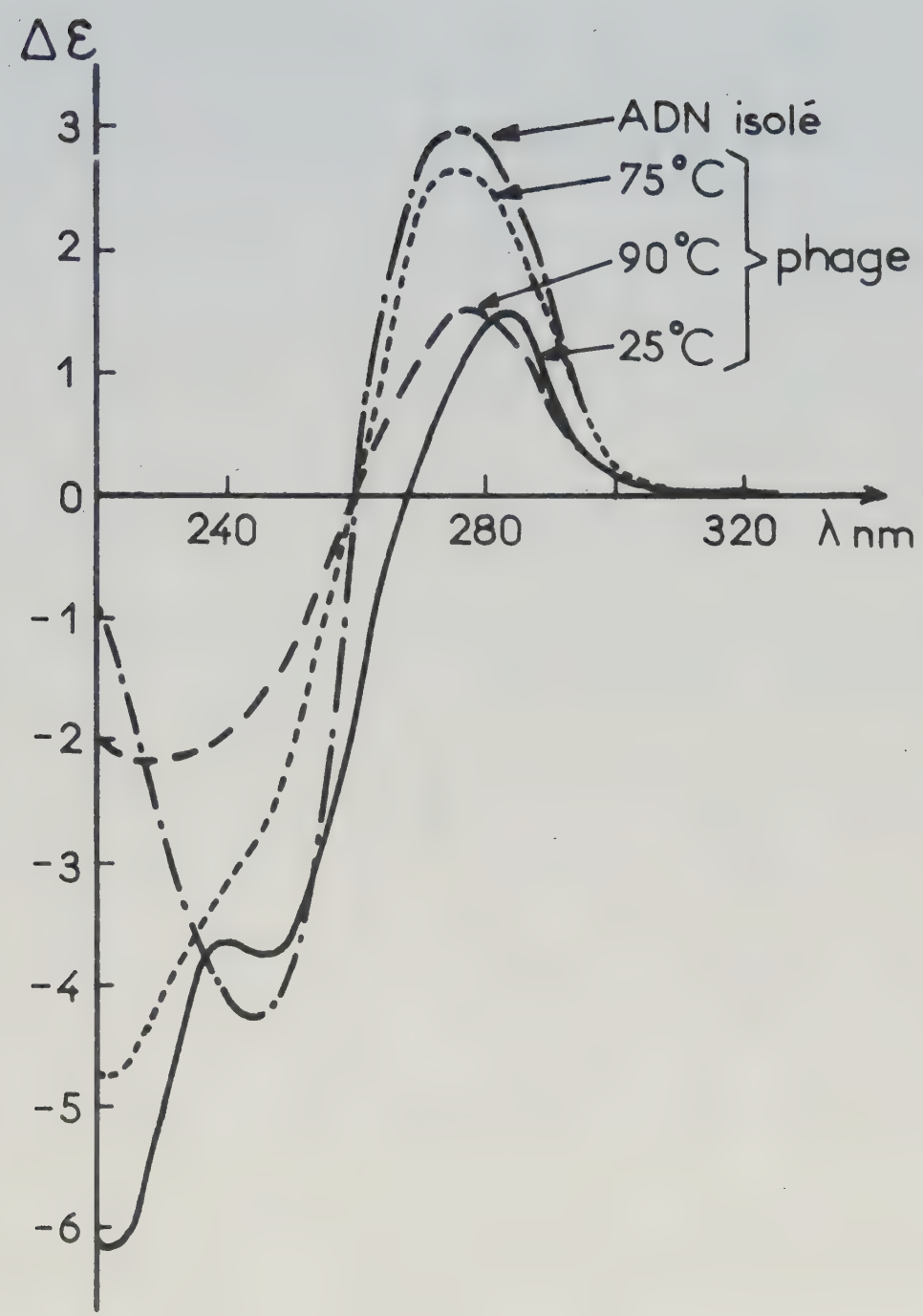


Fig. 13 : Spectres de D.C. du bactériophage T7 à trois températures (25°C, 75°C et 90°C) et spectre de l'ADN isolé du phage (T=25°C) (conditions, comme Fig.11).

TABLEAU V

Caractéristiques des spectres de D.C. du bactériophage T7 à trois températures et de l'ADN isolé.

	Bactériophage T7			ADN isolé
	T = 25°C	T = 75°C	T = 50°C	T= 25°C
Maximum positif	λ= 285 nm Δε=+1,47($M^{-1}cm^{-1}$)	λ= 275 nm Δε=+2,65	λ= 275 nm Δε=+1,47	λ= 275 nm Δε=+3,0
Point de renversement	λ = 268 nm	λ = 260 nm		λ = 260 nm
Minimum négatif	λ = 247 nm Δε=-3,8	disparaissent		λ = 245 nm Δε=-4,3
Maximum négatif	λ = 240 Δε = - 3,6			—
Deuxième minimum négatif	λ = 222 nm Δε = - 6,2	λ = 222 nm Δε = - 4,7	λ = 230 nm Δε = - 2,2	—

Discussion sur la dénaturation thermique du bactériophage T7

La première transition (autour de 60°)

L'augmentation de l'activité optique de l'ADN "in situ" (caractérisée par la bande positive du spectre de D.C. Fig. 13A:b) suggère que cette transition conduit vers une conformation dont les interactions des bases successives sont plus grandes qu'à l'état natif. Après la transition, l'activité optique de l'ADN "in situ" est très proche de celle de l'ADN isolé du phage. La conformation de ce dernier est type "B" selon son activité optique.

La diminution de l'absorption est due en grande partie (2/3) à la diminution de la diffusion de la lumière ; et le reste est provoqué par le renforcement des interactions d'empilement des bases (Permogorov et al 1977 , Monaselidze et al 1978 , Tóth et Fekete 1979)

La dénaturation thermique du phage T7 et la transition autour de 60°C ont été déjà l'objet d'un certain nombre d'études, dont les résultats les plus importants sont les suivants :

- Les phages perdent l'activité biologique pendant cette transition (Fejgin, Rontó et al en prep).

La sensibilité UV des phages après la transition se rapproche de celle de l'ADN isolé. (Fekete, Rontó 1980).

- Par absorption UV differentielle Fekete, Rontó (1980) ont trouvé qu'après la transition l'absorption des phages se rapproche aussi de celle de l'ADN isolé.
- La superhélicité disparait en cours de la transition selon les études en diffusion des rayons X sous les petits angles (Fejgin et al en prep.)
- Les températures caractéristiques des changements observés different légèrement. Tous ces changements sont inversibles.

Les résultats que nous avons obtenus en D.C. sur la première transition du phage T7 (autour de 60°C) et les résultats que nous avons résumés ci-dessus sont en accord avec l'hypothèse formulée par Tickonenko (1969) qu'au cours de cette transition l'ADN sort de la capside phagique et s'allonge.

Les paramètres biologiques et physiques de la conformation de l'ADN, "sorti" sont très proches de ceux de la conformation de l'ADN isolé. Le fait qu'ils ne soient pas tout à fait identiques pourrait être expliqué d'une part par la présence des capsides dans la solution qui entrainerait une modification des paramètres mesurés et, d'autre part, par les interactions possibles de l'ADN "sorti" avec les protéines.

La deuxième transition (autour de 85°C).

La dminution coopérative de l'activité optique de l'ADN signifie que l'interaction des bases nucléiques diminue grace aux changements conformationels.

L'augmentation de l'absorption montre aussi cette diminution des interactions.

Cette transition a été attribuée à la transition hélice pelote de l'ADN relaxé,(Monaselidze et al 1978), ce qui signifie la nature des liaisons-H entre les bases complémentaires et aussi les changements de la position relative (distances et angles) des bases successives.

La séquence et la régularité des bases déterminent la température de transition, la structure fine et la coopérativité de la fusion (Pavlov et al 1977).

La structure fine observée en absorption montre en accord avec les résultats des études en microcolonimétrie que la transition se déroule en deux étapes due probablement à deux sortes d'interaction stabilisants et destabilisants entre l'ADN et les protéines qui restent en liaison avec l'ADN relaxé.

En D.C. cette structure fine n'a pas été observée, soit à cause de la précision insuffisante de la mesure de température, soit parce que la modification de la chiralité se déroule en une étape. La bonne concordance entre les températures caractéristiques T_{2A} et T_{2Ar} montre que les deux paramètres optiques sont sensibles au même changement de conformation.

Conclusions : L'activité optique de l'ADN in situ montre de grandes variations de la conformation au cours des deux transitions.
Les changements spectraux sont en accord avec l'hypothèse sur la nature des transitions : sortie de l'ADN de la capside et transition hélice-pelote.

Remarques : 1) Les déplacements des longueurs d'onde caractéristiques des spectres D.C. peuvent être en relations avec la diffusion differentielle de la lumière, c'est pourquoi on ne peut pas les interpréter comme changement conformationel des bases. Les changements des minima et maxima négatifs dépendent aussi de la dénaturation thermique des protéines du phage.
Ces deux phénomènes interessants sont à développer ultérieurement.

2) La dénaturation thermique des phages à acide nucléique monocaténaire (MS-2, Φ174) montre des changements non-coopératifs des paramètres optiques et une précipitation qui perturbe les mesures.

5.2.3. Effet d'une petite dose d'irradiation UV sur le processus de fusion de l'ADN "in situ".

Les photoréactions des bases nucléiques (Chapitre II:2.1) provoquent généralement des changements de leur structure électronique qui peut influencer leur activité optique.

Nous avons étuidé les variations de l'activité optique de l'ADN "in situ" par le processus de fusion. Avec la petite dose utilisée ($3x10^{16}$ photons/cm^2 ∿ 0,2kJ/m^2 et à λ = 254 nm), seules les courbes de fusion ont montré des changements significatifs tandis que ce n'étaient pas le cas pour les spectres de D.C. et d'absorption eux-mêmes. En effet il a été observé un changement du maximum positif du spectre D.C. mais avec une plus grande dose (>5kJ/m^2), appliquée sur l'ADN isolé (Lang et al, 1973 ; Toulmé et Hélène, 1977 ; Paleček, 1971).

Pour discuter nos résultats nous avons utilisés les courbes de fusion en D.C. de l'ADN "in situ" (à λ = 280nm). Nous avons étudié aussi les changements du maximum d'absorption mais

ils n'ont pas été indicatifs.

La courbe de fusion en D.C. du phage T7 irradié est présentée sur la Fig. 12-A :c,et sa première dérivée sur la Fig. 12-B: Lorsqu'on compare les deux courbes de fusion en D.C., celle du phage irradié et celle du phage non-irradié (Fig. 12A:b,c) on observe les différences suivantes :

1) Au cours de la première transition l'augmentation de l'activité optique est plus petite pour le phage irradié (l'augmentation de 95%) que pour le phage non-irradié (108%).

La première transition - la sortie de l'ADN de la capside se déroule dans la même plage de température pour les phages irradiés et non-irradiés.

2) La deuxième transition est caractérisée par une diminution de l'activité optique. Cette diminution est plus petite pour les phages irradiés. A la fin du processus le niveau de la courbe reste plus élevé (15% par rapport au niveau natif) dans le cas du phage irradié (courbe c) que dans le cas du phage non-irradié (8% courbe b)

La température caractéristique de cette transition pour le phage irradié (Fig. 12-Bγ) est :

$$T^{irr}_{2\Delta\varepsilon} = 84,25 \pm 0,25^{\circ} C$$

tandis que pour le phage non irradié elle a été

$$T_{2\Delta\varepsilon} = 86,75 \pm 0,25^{\circ}C$$

et la différence

$$\Delta T_{2\Delta\varepsilon} = T_{2\Delta\varepsilon} - T^{irr}_{2\Delta\varepsilon} = 2,5 \pm 0,5^{\circ}C$$

On peut supposer que la présence des photoproduits formés sous l'irradiation -environ 1 dimère par 1000 bases pyrimidiques provoquent des changements dans les paramètres angulaires de l'empilement des bases. Ces changements ne sont pas suffisants pour l'observation de fusion en absorption, mais ils se manifestent dans l'instabilité de l'hélicité - observée dans la diminution de la température de transition de l'activité optique.

CONCLUSION

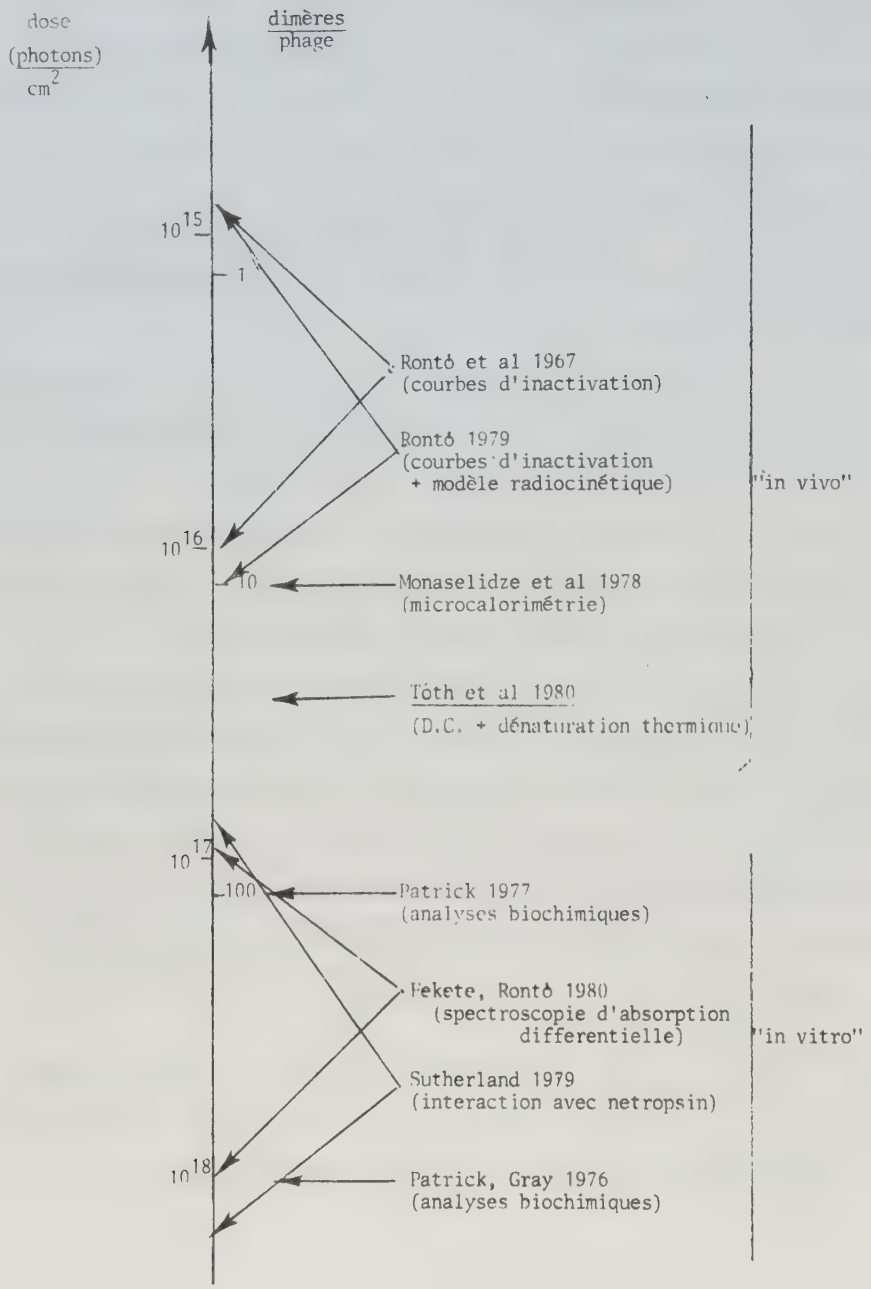
La conformation 'in situ" des différents acides nucléiques a été étudiée par la spectrométrie d'absorption UV et de dichroïsme circulaire.

Les caractéristiques sur les structures de l'ADN monocatenaire et bicatenaire ainsi, que de l'ARN monocaténaire ont été obtenus.

Les spectres de D.C. à plusieurs températures nous ont permis démontrer les différentes conformations de l'ADN bicatenaire du bactériophage T7, liées aux transitions des phases.

L'effet, de très petites doses du rayonnement UV (3×10^{16} photons/cm^2, proche des doses d'intérêt biologique : $\sim 10^{15}$ photons/cm^2) a été étudié en D.C. par la comparaison entre les courbes de fusion des phages, irradiés et non irradiés. Ainsi les modifications structurales dûes à la destabilisation de la conformation hélicoidale de l'ADN après l'irradiation pourraient être responsables des endomagements biologiques (mutations, léthalité).

Par la valeur de la dose d'irradiation UV utilisée, la présente étude prend une place intermédiaire entre les études biologiques et biochimiques comme le montre le tableau ci-dessous :



A partir de cette étude on peut développer des études sur la relation entre la dose d'irradiation et le changement de la température de la fusion de l'ADN. Il est aussi intéressant à suivre en D.C. la dénaturation thermique du bactériophage T7 par absorption différencielle de différentes longueurs d'ondes. Cela permettra de connaître d'avantage les changements conformationnels possibles de l'ADN et des protéines des bactériophages.

BIBLIOGRAPHIE

Agamalian M.M., Drabking M., Dovgikov A.A., Lvov J.M., Rontó Gy (1979) "Investigation of the Internal Structure of the Bacteriophage T7 by Small-angle Neutron Scattering."
Izd. Lijaf 538 1-14.

Arnott S. (1970) "The geometry of Nucleic Acids"
Progr. in Biophys. and Mol. Biol. 24 265-319.

Bahr G.I., Engler W.F., Mazzone H.M. (1976) "Determination of the Mass of viruses by Quantitative Electron Microscopy"
Quat. Rev. Biophys. 9 459-489

Bayley J. (1973) "The Analysis of Circular Dichroism of Biomolecules." Progr. in Biophys. and Mol. Biol. 27 1-76.

Berkaloff A. Bourguet J. et al. (1978) "Structure des bactériophages" dans " Biologie et Physiologie Cellulaires" (ed. Hermann Paris) Vol. 11 chap. 10.2 pp. 168.

Brahms J., Mommaerts W.7.H.M. (1964) "Study of Conformation of Nucleic Acids in Solution by Means of Circular Dichroism.
J. Mol. Biol. 10 73.

Brahms J. (1970) "Recent Advances in Optical Activity Investigations of Nucleic Acids and Polynucleotides." in "Fond. Asp. and Rec. Developements in ORD and CD" (Ciardelli I. and Salvadori P. eds.)

Brown N.L., Smith M. (1977) "DNA Sequence of a Region of the IX 174 Genome Coding for a Ribosome Binding Site"
Nature 265 695-698.

Buch C.A., Brahms J. (1967) "Optical Activity of Single-Stranded Oligonucleotides"
J. Chem. Phys. 46 79-88.

Buch C.A. (1971) "Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism" in "Physical Techniques in Biological Research" (Oster G. ed. Academic Press New York) Vol. 1 Part. A. 347-408.

Camerini-Otero R.D., Posey P.N., et al. (1974) "Intensity Fluctuation Spectroscopy of Laser Light Scattered by Solutions of Spherical Viruses." Biochemistry 13 (5) 960-970.

Cech C.L., Tinoco Jr. I. (1976) "Circular Dichroism Calculations for Polyinosinic Acid in Proposed Multistranded Geometry" Nucl. Acids Res. 3 399-404.

Clark L.B., Tinoco Jr. I. (1965) "Correlation in UV Spectra of Purine and Pyrimidine Bases." Y.A.C.S. 87 11.

Cummings D.A., Kozloff L. M. (1960) "Biophysical Properties of Bacteriophage T2." B.B.A. 44 445-458.

Davison P.I., Freifelder D. (1962) "The Physical Properties of T7 Bacteriophage." J. Mol Biol. 5 635-642.

DeGroot G., Greve J, Blok J. (1977) "Transient Electric Birefrigence of the Bacteriophage T3 and T7" Biopolymers. 16 639-654.

Delbruch M. (1946) "Bacterial Viruses or Bacteriophages" "Biol. Rev. Cambridge Phys. Soc. 21 30-40.

Delbruck M., Bailey Yr. W. T. (1946) "Induced Mutations in Bacteria Viruses" Cold. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol. 11 33.

Demerec M., Fano U. (1945) "Bacteriophage-resistant Mutants in Escherichia coli" Genetics 30 119-136.

Denhardt D.T. (1975) "Single-Stranded DNA Phages" C.R.C. Crit. Rev. Microbiol. 4 161-222.

Elford W. J., Andrewes C.H. (1932) British Journal of Experimental Pathology 13 446.

Emerson T.R., Swan R.J., Ulbricht T.L.V. (1967) "Optical Rotatory Dispersion of Nucleic Acid Derivatives II. "Biochemistry 6 543.

Fejgin L.A., Rontó Gy., et al. (1980) communications privées soumises pour publication in Dotcl. Akad. Nauk.

Fekete A., Rontó Gy. (1980) "The Role of DNA-Protein Interactions in the UV Damage of T 7 Bacteriophage at High Fluences" Studia Biophys. 80 (3) 165-171.

Fiers W, Contreras R., et al. (1975) "A Protein Gene of Bacteriophage MS2 "Nature 265 273-278.

Fiers W., Contreras R., et al (1976) "Complete Nucleotide Sequence of Bacteriophage MS2 RNA" Nature 260 500-507.

Fraser D., Williams E.C. (1953) "Details of Frosen-dried T3 and T7 Bacteriophages as Shown by Electron Microscopy." J. Bacteriol. 65 458-464.

Freifelder D. (1970) "Molecular Weights of Coliphages and Coliphage DNA. IV." J. Mol. Biol. 54 567-577.

Gáspár S., Rontó Gy., Müller G. (1979) "Determination of Biological Parameters of Bacterium-Phage Complexes" Zeitschift für Alleg. Microbiol. 19 (3) 163-169.

Gates F.I. (1930) Journal of General Physiology 14 31.

Grachev M.A., Zaychikov K.I., Maksimova T.G., Pletnev A.G. (1979) "Sequence of T7 DNA in the Region of Gene I." Bioorg. Khim. SUN. 28 (1) 1587-1590.

Hall C.E., Maclean E.C., Tessman J. (1959) "Structure and Dimensions of Bacteriophage I X 174 from Electron Microscopy" J. Mol. Biol. 1 192-194.

Holzwarth G., Gordon D.G., et al (1974) "Mie Scattering Contributions to the Optical Density and Circular Dichroism of T2 Bacteriophage." Biochemistry 13 (1) 126-131.

Hug W. Tinoco Jr. I. (1973) "Electronic Spectra of Nucleic Acid Bases I." J. A.C.S. 95 2803-2813.

Kaplan R.W. (1952) "Auslösung Von Farbektor and anderen Mutationen bei Bacterium prodigiosum durch Monochromodisches Ultraviolett verschiedener Vallenlängen" Z. Waturforsch. 3. 7 291-304.

Knight C.A. (1974) "Molecular Virology" (Mc Graw-Hill, New York)

Kosturko L.D., Hogan M. Dattagupta N. (1979) "Structure of DNA within Three Isomerie Bacteriophages" Cell 16 515-522.

Lang H., Luck G. (1973) "UV Light Induced Conformational Changes in DNA" Photochem Photo-biol. 17 387-393.

Langridge R., Marmur J. (1964) "X-ray Diffraction Study of DNA which contains Uracil" Science 143 1450.

Latimer P. (1972) "Dependence of Extinction Efficiency of Spherical Scatterers on Photometer Geometry."

Lunan K.D., Sinsheimer R.L. (1956) "A Study of the Nucleic Acid of Bacteniophage T7" Virology 2 455-462.

Mandell J.D., Hershey A.D. (1969) "A Fractionating Column for Analysis of Nucleic Acids" Anal. Biochem. I 66-77.

Mc Donell M.W., Simon M.N., Studier F.W. (1977) "Analysis of Restriction Fragments of T7 DNA and Determination of Molecular Weights by Electrophotesis in Neutral and Alcaline Gels." J. Mol. Biol. 110 119-146.

Min Jou W., Haegeman G., Irebaert H., Fiers W. (1972) "Nucleotide Sequence of the Gene Coding for the Bacteriophage MS2 Coat Protein" Nature 237 82-88.

Mistra D.N., Sinha R.K. Das Gupta N.N. (1969) "Molecular Weight of DNA from Coliphage T7 by Electron Microscopy" Virology 39 183-193.

Módos K., Gáspár S. résultats non-publiés.

Moffitt W.M. Moscowitz. A. (1959) "Optical Activity in Absorbing Media." J. Chem Phys. 30 (3) 648-660.

Monaselidze D.Z., Fekete A., Rontó Gy, et al. (1978) "Thermodinamical Properties of Phage T7" Studia Biophys. 70 213-220.

Moscowitz A. (1960) "Theory and Analysis of Rotatory Dispersion Curves" in "Optical Rotary Dispersion" (Djerassi C. ed., Mc Graw-Hill, New York 150-177.

North A.C.T., Rich A. (1961) "X-ray Diffraction Studies of Bacterial Viruses" Nature 191 1242-1245.

Oakley J.L., Coleman J.E. (1977) "Structure of a Promoter for T7 RNA-Polymerese." Proc. Natl. Acad. Sci. 74 4266-4270.

Oriel P.J., Wilder J. (1967) "Optical Rotatory Dispersion of Double Stranded RNA." Nature 214 702.

Palecek E. (1976) "Premelting Changes in DNA Conformation." Prog. Nucl. Acid. Res. and Mol. Biol. 18 151-213.

Patrick M.H., (1976) "Physical and Chemical Properties of DNA." in "Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids" (Wang S.Y. ed. Academic Press, New York) Vol. II chap. 1 1-34.

Patrick M.H., (1977) "Studies on Thymine-Derived UV Photoproducts in DNA.I. "Photochem. Photobiol. 25 (4) 357-372.

Patrick M.H., Gray D.M. (1976) "Independence of Photoproduct Formation on DNA Conformation" Photochem. Photobiol. 24 507-513.

Pauling L. (1960) "The Nature of the Chemical Bond" (3rd. ed. Ithaca Cornell Univ. Press.)

Pavlov V.M., Lyubchenko Yu L, et al. (1977) "Specific Fragmentation of T7 phage DNA at Low Melting Sites" Nucl. Acid Res. 4 (11) 4053.-4062.

Permogorov V.I. Tyaglov B.V., et al. (1977) "Scattering Contribution to the Optical Density During Melting of T7 and Sd Phages" Molekularnaya Biologia 11 (1) 134-138.

Raveteli J.V., Model D., Robertson H.D. (1977) "Isolation and Characterisation of the IX 174 Ribosome Binding Sites" Nature 265 698-702.

Ronto Gy., Tarján I. (1967) "Zur Reaktivierung der Stranlenchäden der Coliphagen T7" Strahlentherapie 132 (1) 143-148.

Rontó Gy. (1979) "Investigations of the Point-Damages of Bacteriophages and of Phage-composants" Thèse (en Hongrois) à 1'Académie de Sciences Hongroise.

Rosenberg M., Kramer Z.A. (1977) "Nucleotide Sequence Surrounding a Ribonuclease III." Proc. Natl. Acad. Sci. 74 984-988.

Sanger F., Air G.M., et al. (1977) "Nucleotide Sequence of Bacteriophage I X 174 DNA" Nature 265 687-695.

Serwer Ph. (1976) "Internal Proteins of Bacteriophage T7" J. Mol. Biol. 107 271-291.

Serwer Ph. (1978) "A Technique for Observing Extended DNA in Negatively Stained Specimens" J. Ultra-structure Res. 65 112-118.

Sinsheimer R.L. (1959) "Purification and Properties of Bacteriophage IX 174." J. Mol. Biol. 1 37-47.

Smith. M., Brown N.L., et al. (1977) "DNA Sequence of the C Termini of the Overlapping Genes A and B in Bacteriophage IX 174."

Specher C.A., Johnson Jr. W.C. (1978) "Circular Dichroism of DNA" Biophys. J. 21 210A.

Steitz J.A., (1968) "Isolation of the A Protein from Bacteriophage" J. Mol. Biol. 33 947-951.

Strauss Jr. J. H., Sinsheimer R.L. (1963) "Purification and Properties of Bacteriophages MS2 and of its Ribonucleic Acid." J. Mol. Biol. 7 43-54.

Studier F.W. (1965) "Sedimentation Studies of the Size and Shape of DNA." J. Mol. Biol. 11 373-390.

Studier F.W. (1969) "The Genetics and Physiology of Bacteriophage T7" Virology 39 562-574.

Studier F.W. (1972) "Bacteriophage T7" Science 174 367-376.

Sussman J.L., Trifonov E.N. (1978) "Possibility of Non-Kinked Packing of DNA in Chomatin" Proc. Natl. Acad. Sc. 75 (1) 103-107.

Sutherland J.C., Duval J.F., et al. (1979) "Netropsin : Interaction with UV-irradiated DNA" Photochem. Photobiol. 29 943-949.

Tamàs Gy., Rontó Gy., Pozsonyi T. (1966) "Agar Gel Diffusion Test on Bacteriophages" Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 1 179-186.

Thomas J.B.G.J., Prescott B. (1976) "Studies of Virus Structure by Laser-Raman Spectroscopy II. MS2" J. Mol. Biol. 102 103-124.

Tichonenko T.N., Dobrov E.N., et al. (1966) "Pecularities of the Secondary Structure of Phage DNA "in situ" J. Mol. Biol. 18 58-67.

Tinoco Jr. I. (1968) "Optical Properties of Polynucleotides" J. Chem. Phys. 65 91.

Tinoco Jr. I. (1979) "Circular Dichroism and Fluorescence Detected Circular Dichroism of Marcromolecules" in "Optical Activity and Chiral Discrimination" (ed. Mason S.I.) 57-85.

Tőth K. (1979) "La diffusion de la lumière par les bactéries et les virus en solution" Etude (en Hongrois) pour le concours national de Biophysique en Hongrie.

Tőth K, Fekete A. "Effect of the microenvironement on the structure of virus-solutions" Acto-Biochimie, Biophy. Acad. Sc. Mung. (in press.)

Tóth K., Bolard J., Rontó Gy., Aslanian D. (1980) "Application of the C.D. to study "in vivo" the UV domages of the Bacteriophage T7" VIIIe Congrès Internat. de Photobiol., Strasbourg.

Toulmé J.J., Helène C. (1977) "Specific Recognition of Single-Stranded Nucleic Acids" J. Biophys. Chem. 252 (1) 244-249.

Tunis-Schneider M.Y.B., Maestre M.I. (1970) "Circular Dichroism Spectra of DNA Films" J. Mol. Biol. 52 251.

Yang J.T., Samejima T., Sarkar P. K. (1966) "Optical Rotatory Dispersion of Mononucleosides and Mononucleotides" Biopolymers 4 623.

Yang J.T., Samejima T. (1969) "Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism of Nucleic Acids." Progr. Nucleic Acid Res. and Mol. Biol. 9 223-300.

Wang S.Y. (1976) "Pyrimidine Bimolecular Photoproducts" in "Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids (Wand S.Y. ed. , Academie Press, New York) Vol. 1 Chap. 6 296-351.

Watson J.D. (1968) "Biologie Moléculaire du Gène" (Ediscience, Paris) P.P. 130.

Weismann C., Billeter M.A., et al. "Structure and Fuction of Phage RNA" Ann. Rew. Biochem. 42 303-328.